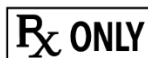


**Zum qualitativen Nachweis von viraler RNA des humanen Coronavirus SARS-CoV-2, die aus Nasen- und Nasenrachenabstrichen extrahiert wird.**

Für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.



Auf [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary) finden Sie ein Glossar der Symbole.

**INHALT**

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG..... 2

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS ..... 3

BEREITGESTELLTE MATERIALIEN ..... 4

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN ..... 4

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN ..... 4

Lagerung und Handhabung von Kit-Reagenzien..... 6

    Anzeichen einer Instabilität oder Zersetzung der Reagenzien..... 6

Probenentnahme, Lagerung und Handhabung ..... 6

    Lagerung von Nukleinsäureextrakten ..... 6

        bioMérieux NucliSENS easyMAG Nucleic Acid Extraction (Nukleinsäureextraktion) Anleitung zum Programmieren..... 6

ASSAY-VERFAHREN ..... 8

    Verfahren zum Rehydrieren des Mastermix ..... 8

    RT-PCR Einrichtungsverfahren ..... 9

QUALITÄTSKONTROLLE..... 9

KLINISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT..... 11

ANALYTISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT ..... 11

    Nachweisgrenze ..... 11

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT (Inklusivität) ..... 15

ANALYTISCHE SPEZIFITÄT (Kreuzreaktivität) ..... 15

EINSCHRÄNKUNGEN..... 17

KUNDENSERVICE UND TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG ..... 18

GEISTIGES EIGENTUM..... 18

LITERATUR ..... 19

ANHANG (spezifische Programmier- und Testprotokolle für jeden Thermocycler) ..... 20

    Anleitung zum Programmieren von Applied Biosystems 7500 Fast Dx ..... 20

    Applied Biosystems 7500 Fast Dx Thermocycler Testverfahren ..... 21

Anleitung zum Programmieren von Applied Biosystems 7500 Standard.....	22
Applied Biosystems 7500 Standard Thermocycler Testverfahren .....	24
Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler Programmiervorgang .....	25
Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler Testverfahren.....	27
Qiagen Rotor-Gene Q Programmieranweisungen .....	28
Qiagen Rotor-Gene Q Testlauf.....	30
Roche LightCycler 480 Instrument II Programmieranweisungen.....	30
Erstellung einer Vorlage für den LightCycler 480 II Assay-Lauf.....	30
Erstellung eines LightCycler 480 II Assay-Testverfahrens .....	31
Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro Programmieranweisungen .....	32
Erstellung eines Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro Testverfahrens .....	34
GLOSSAR .....	36



## VERWENDUNGSZWECK

Der Lyra SARS-CoV-2-Assay ist ein RT-PCR-Assay in Echtzeit für den qualitativen *In-vitro*-Nachweis von Nukleinsäure des SARS-CoV-2 in Nasen-, Nasenrachen- oder Mundrachenabstrichproben (NP- oder OP-Abstrichproben) von Patienten, bei welchen der Gesundheitsdienstleister eine COVID-19-Infektion vermutet. Der Assay zielt auf das nicht strukturelle Polyprotein (pp1ab) des SARS-CoV-2-Virus ab. Der autorisierte Test umfasst die Nukleinsäure-Extraktion mit dem bioMérieux NucliSENS easyMAG System oder dem EMAG System, gefolgt von der RT-PCR auf dem von der FDA zugelassenen Real-Time PCR Instrument.

Die Ergebnisse dienen der Identifikation von SARS-CoV-2-RNA. Das SARS-CoV-2 ist im Allgemeinen während der akuten Infektionsphase in Proben aus den oberen Atemwegen nachweisbar. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin. Um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen, ist die klinische Korrelation mit der Krankengeschichte des Patienten und anderen diagnostischen Informationen erforderlich. Positive Ergebnisse schließen eine bakterielle Infektion bzw. eine Co-Infektion mit anderen Viren nicht aus. Labore innerhalb der USA und seiner Gebiete müssen alle positiven Ergebnisse an die entsprechenden öffentlichen Gesundheitsbehörden melden.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und dürfen nicht die alleinige Basis für Patienten-Management-Entscheidungen darstellen. Negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Krankengeschichte des Patienten und epidemiologischen Informationen verknüpft werden.

Der Lyra SARS-CoV-2-Assay ist für die Verwendung durch qualifiziertes und geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das in die Techniken der PCR in Echtzeit und *In-vitro*-Diagnostik-Verfahren eingewiesen und dementsprechend geschult wurde.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

SARS-CoV-2, auch als COVID-19-Virus bekannt, wurde erstmals im Dezember 2019 in Wuhan, in der Provinz Hubei, China, identifiziert. Es wird angenommen, dass dieses Virus, wie auch die neuartigen Coronaviren SARS-1 und MERS, von Fledermäusen stammen, jedoch ist es auch möglich, dass SARS-CoV-2 einen Zwischenwirt, wie Schuppentiere, Schweine oder Zibetkatzen, hatte.<sup>1</sup> Bis März 2020 hatte sich die Infektion beim Menschen in über 74 Ländern verbreitet, mehr als 92.000 Personen infiziert und 3.100 getötet.<sup>1</sup> Am 11. März rief die WHO SARS-CoV-2 als globale Pandemie aus.

Die mittlere Inkubationszeit wird auf 5,1 Tage geschätzt, wobei das Auftreten von Symptomen innerhalb von 12 Tagen nach der Infektion erwartet wird.<sup>3</sup> Die Symptome von COVID-19 ähneln anderen viralen Atemwegserkrankungen und beinhalten Fieber, Husten und Atemnot.<sup>4</sup>

Der Lyra SARS-CoV-2-Assay wurde speziell für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA entwickelt.

## GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Der Lyra SARS-CoV-2 Assay weist die virale RNA des SARS-CoV-2 nach, die entweder anhand des bioMérieux NucliSENS® easyMAG® Systems oder EMAG® Systems aus einer Patientenprobe extrahiert wurde. Eine Multiplex Real Time RT-PCR-Reaktion wird unter optimierten Bedingungen in einem Einzelröhrchen durchgeführt, wobei Amplifikate für das Zielvirus (falls vorhanden) und die Prozesskontrolle (PRC), die in der Probe vorhanden ist, generiert werden. Diese Reaktion wird mithilfe eines von sechs thermocyclern durchgeführt: Applied Biosystems® 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler® 480, Qiagen Rotor-Gene® Q, Bio-Rad CFX96 Touch™, Thermo Fisher QuantStudio® 7 Pro. Die Identifizierung des SARS-CoV-2-Virus erfolgt anhand der Verwendung von zielspezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden, die sich an eine konservierte Region des nicht strukturellen Polyproteins des SARS-CoV-2-Virus anlagern.

Lyra SARS-CoV-2-Assay – Sondenetiketten	
Ziel	Farbstoff
Nicht strukturelles Polyprotein (pp1ab)	FAM
Prozesskontrolle (PRC)	Quasar® 670

Zusammenfassung des Verfahrens:

- 1. Probenentnahme:** Nasenrachen-, Mundrachen- oder Nasenabstriche anhand von Standardtechniken von symptomatischen Patienten entnehmen. Diese Proben werden gemäß etablierten Laborverfahren transportiert, gelagert und verarbeitet.<sup>1</sup>
- 2. Nukleinsäure-Extraktion:** Aus den Proben gemäß den Herstellerangaben und unter Verwendung eines geeigneten Reagenz (siehe **Benötigte aber nicht bereitgestellte Materialien**) Nukleinsäuren mit dem NucliSENS easyMAG oder EMAG System extrahieren.  
Vor der Extraktion jedem 180-µl-Probenaliquot oder jeder Kontrolle 20 µl Prozesskontrolle (PRC) hinzufügen. Die PRC dient der Überwachung von Hemmern in der extrahierten Probe, stellt sicher, dass eine angemessene Amplifikation stattgefunden hat und bestätigt, dass die Nukleinsäure-Extraktion ausreichend war.
- 3. Rehydrierung des Mastermix:** Den lyophilisierten Mastermix unter Verwendung von 135 µl Rehydrierungslösung rehydrieren. Der Mastermix enthält Oligonukleotidprimer, Fluorophore und Quencher-markierte Sonden, die auf konservierte Regionen des SARS-CoV-2 sowie die Prozesskontrollsequenz ausgerichtet sind. Die Sonden sind zweifach markiert: mit einem am 5'-Ende gebundenen Reporterfarbstoff und einem am 3'-Ende gebundenen Quencher. Der rehydrierte Mastermix ist ausreichend für acht Reaktionen.
- 4. Amplifizierung und Nachweis von Nukleinsäure:** Jeweils 15 µl rehydrierten Mastermix jeder Testplattenvertiefung (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, the Roche LightCycler 480) oder jedem Reagenzröhrchen (Qiagen Rotor-Gene Q) hinzufügen. Anschließend werden 5 µl extrahierte Nukleinsäuren (Probe mit PRC) in die Testplattenvertiefung oder das Röhrchen gegeben. Die Testplatte oder das Reagenzröhrchen in dem entsprechenden Gerät platzieren.

Nach Platzierung der Testplatte oder des Reagenzröhrchens in dem Gerät wird das Assay-Protokoll initialisiert. Dieses Protokoll initialisiert die reverse Transkription von RNA-Zielen zur Generierung komplementärer DNA und anschließender Amplifizierung von Zielsequenzen. Der Lyra SARS-CoV-2-Assay basiert auf der TaqMan® Chemie unter Verwendung eines Enzyms mit reverser Transkriptase, DNA-Polymerase und 5'-3'-Exonuklease-Aktivitäten. Während der DNA-Amplifikation, spaltet dieses Enzym die auf die komplementäre DNA-Sequenz ausgerichtete Sonde und trennt den Quencher-Farbstoff vom Reporterfarbstoff. Dieser Schritt verursacht einen Anstieg des Fluoreszenzsignals bei Anregung durch eine Lichtquelle einer geeigneten Wellenlänge. Mit jedem Zyklus werden weitere Farbstoffmoleküle von ihren Quenchern getrennt, was zu weiteren Signalen führt. Wenn eine ausreichende Fluoreszenz erreicht ist, wird die Probe für die nachgewiesene Zielsequenz als positiv beurteilt.

## BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Kat.-Nr. M120

Nachweis-Kit (96 Reaktionen) – Bei 2 °C bis 8 °C lagern		
Nr.	Komponente	Menge
①	Rehydrierungslösung Art.-Nr. M5003	1 Fläschchen/Kit, 1,9 ml
②	Lyra SARS-CoV-2 Mastermix Art.-Nr. M5150 Lyophilisierter Inhalt: DNA-Polymerase-Enzym mit reverser Transkriptase-Aktivität Oligonukleotid-Primerpaare; Oligonukleotid-Proben dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Stabilisatoren	12 Fläschchen/Kit, 8 Reaktionen/Fläschchen
CONTROL	Prozesskontrolle Art.-Nr. M5273	1 Fläschchen/Kit 2,0 ml
CONTROL +	Positivkontrolle mit synthetischer SARS-CoV-2 RNA, Art.-Nr. M5153	1 Fläschchen/Kit 1,0 ml
CONTROL -	Negativkontrolle Art.-Nr. M5275	1 Fläschchen/Kit 1,0 ml

## BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

- Mikropipetten (Bereich zwischen 1–10 µl und 100–1000 µl)
- Aerosolfreie Pipettenspitzen
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Softwareversion 1.4
- Applied Biosystems 7500 Standard, Softwareversion 2.0.6
- Roche LightCycler 480 Instrument II, Softwareversion 1.5.0.39
- Qiagen Rotor-Gene Q, Softwareversion 2.0.2.4
- Bio-Rad CFX96 Touch, Softwareversion 3.1
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, Softwareversion 2.0
- PCR-Platte mit 96 Vertiefungen
  - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
  - ▶ Applied Biosystems 7500 Standard: N8010560
  - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, inklusive Folie
  - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, Verschlussfolie MSB1001
  - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro: 4483354
- Optische Plattenfilme
- Qiagen Rotor-Disc
- Qiagen Rotor-Disc Folie zur Heißsiegelung
- Plattenzentrifuge für Platte mit 96 Vertiefungen
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Softwareversion 2.0
- bioMérieux EMAG Softwareversion 2.0
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Puffer 1, 2, 3
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Lysepuffer
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Silica-Magnetkügelchen
- bioMérieux NucliSENS easyMAG Einwegprodukte
- Biohit Pipette

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lokale, länderspezifische oder bundesstaatliche Vorschriften für die Meldung meldepflichtiger Krankheiten werden laufend aktualisiert und beinhalten eine Reihe von Organismen für Überwachungs- und Ausbruchuntersuchungen. Die Laboratorien sind dafür verantwortlich, die staatlichen und/oder lokalen Vorschriften zu befolgen; sie müssen die lokalen und/oder staatlichen öffentlichen Gesundheitslaboratorien bezüglich Richtlinien für die Einreichung von Isolaten und/oder klinischen Proben konsultieren.

- Für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin.

- Labore innerhalb der USA und seiner Gebiete müssen alle positiven Ergebnisse an die entsprechenden öffentlichen Gesundheitsbehörden melden.
- Der Assay wurde unter Verwendung der bioMérieux NucliSENS easyMAG Software Version 2.0 validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung der Applied Biosystems 7500Fast Dx Software Version 1.4. validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung von Applied Biosystems Standard Software Version 2.0.6. validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung von Roche LightCycler 480 Instrument II, Softwareversion 1.5.0.39 validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung von Qiagen Rotor-Gene Q, Softwareversion 2.0.2.4 validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung von Bio-Rad CFX96 Touch, Softwareversion 3.1 validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Der Assay wurde unter Verwendung von Thermo Fischer QuantStudio 7 Pro, Software Version 2.0 validiert. Bitte wenden Sie sich vor der Modifizierung oder einer Aktualisierung dieser Software, die über diese Softwareversion hinausgeht, an den technischen Support von Quidel.
- Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden nur mit dem unter Verwendungszweck angegebenen Probenotyp festgestellt. Die Leistung dieses Tests mit anderen Probenotypen oder Proben wurde nicht beurteilt.
- Dieses Produkt darf nur von Personen mit ausreichender Schulung in PCR- und RT-PCR-Techniken verwendet werden.
- Alle Proben/Untersuchungsproben als potenziell infektiös behandeln. Bei der Handhabung der Proben, dieses Kits und seinen Inhalten allgemeine Sicherheitsmaßnahmen anwenden.
- Korrekte Entnahme, Lagerung und korrekter Transport der Probe sind eine wesentliche Voraussetzung für korrekte Ergebnisse.
- Assay-Reagenzien gemäß den Angaben auf den jeweiligen Etiketten lagern.
- Bei der Verwendung dieses Kits geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Um genaue Ergebnisse zu erzielen, nur mit kalibrierter Ausrüstung vorsichtig pipettieren.
- Alle Oberflächen mit einer 10%-igen Bleichmittellösung gefolgt von hochreinem Wasser gründlich reinigen und desinfizieren.
- Mikropipetten mit einer Aerosolbarriere oder positiven Einweg-Spitzen für alle Prozesse verwenden.
- Mikrobielle und Kreuzkontaminationen von Kit-Reagenzien sind zu vermeiden. Gute Laborpraktiken einhalten.
- Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht miteinander vermischt werden.
- Mit diesem Kit keine Reagenzien eines anderen Herstellers verwenden.
- Das Produkt nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Eine angemessene Planung der Arbeitsabläufe verringert das Kontaminationsrisiko wesentlich. Labor-Arbeitsabläufe stets unidirektional planen, wobei mit der Prä-Amplifizierung zu beginnen ist und mit der Amplifizierung und der Detektion fortgefahren wird.
- Speziell vorgesehene Materialien und Geräte in den Bereichen vor der Amplifikation während der Amplifikation verwenden.
- Das Bewegen von Personen und Geräten zwischen den Bereichen ist zu vermeiden.
- Amplifikationszubehör ist stets von Vor-Amplifikationszubehör getrennt zu halten.
- Probenröhrchen oder Testplatten nach der Amplifikation nicht öffnen bzw. entsiegeln.
- Amplifiziertes Material sorgsam und gemäß den lokalen Gesetzen und Vorschriften entsorgen, um das Risiko einer Amplicon-Kontamination zu minimieren.
- Für die Reagenzien- oder Probenvorbereitung vorgesehene Materialien nicht für die Verarbeitung der Ziel-Nukleinsäure verwenden.
- Beim Umgang mit dem Inhalt dieses Kits geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.

- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf [quidel.com](http://quidel.com), um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

## LAGERUNG UND HANDHABUNG VON KIT-REAGENZIEN

- Das ungeöffnete Kit bis zum auf der äußeren Kit-Schachtel aufgedruckten Verfallsdatum bei 2 °C bis 8 °C lagern.
- Der rehydrierte Mastermix sollte innerhalb von 2 Stunden nach der Rehydrierung verwendet werden. Übrig gebliebener Mastermix kann bis zu 24 Stunden lang bei –20 °C aufbewahrt werden. Den Mastermix während der Lagerung vor Licht schützen.

## Anzeichen einer Instabilität oder Zersetzung der Reagenzien

Eine Trübheit der Rehydrierungslösung vor dem Verfallsdatum kann auf eine Zersetzung dieses Reagens hinweisen. Kontaktieren Sie den technischen Support von Quidel bzgl. einer Ersatzlieferung.

## PROBENENTNAHME, LAGERUNG UND HANDHABUNG

Nasenrachen-, Mundrachen- oder Nasenproben müssen gemäß CLSI M41-A entnommen, transportiert, gelagert und verarbeitet werden<sup>2</sup>. Proben müssen bis zum Test bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Wenn Proben nicht innerhalb von 72 Stunden nach der Probenentnahme getestet werden können, müssen sie bis zum Testzeitpunkt bei mindestens –70 °C eingefroren werden.

Die folgenden Virustransportmedien (M4, M4-RT, M5, M6, MTM und UTM) (1 ml und 3 ml) sind mit den Lyra Respiratory Assays kompatibel.

CDC Virustransportmedien (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>) sind mit dem Lyra SARS-CoV-2 Assay kompatibel.

## Lagerung von Nukleinsäureextrakten



Eluate aus dem NucliSENS easyMAG können 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C), 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C und einen Monat bei –20 °C bis –70 °C gelagert werden.


## bioMérieux NucliSENS easyMAG Nucleic Acid Extraction (Nukleinsäureextraktion) Anleitung zum Programmieren

**Hinweis:** In jeden Extraktionslauf sollten eine Positiv-Kontrolle (z. B. Lyra SARS-CoV-2, Positiv-Kontrolle Nr. M5153) und eine negative Prozesskontrolle (z. B. Lyra Negativkontrolle Nr. 5275 oder virales Transportmedium oder zuvor charakterisierte CoV-negative Proben) einbezogen werden.

1. Das Gerät einschalten und warten, bis die Gerätelampe ein orangefarbenes Licht zeigt. Anschließend den Computer anschalten/die NucliSENS easyMAG-Software aktivieren. Erst in der Software anmelden, wenn die Gerätelampe ein grünes Licht zeigt.















2. Nach Drücken der Taste „Instrument“ (Gerät)  und der Taste „Reagent Inventory“ (Reagenzienbestand) , die Barcode-Etiketten an Reagenzien anbringen.

3. Zur Eingabe von Proben die Schaltfläche „Daily Use“ (Tägliche Verwendung)  drücken, die standardmäßig

den Bildschirm „Define Request“ (Anfrage definieren)  aufruft. Die folgenden Einstellungen auswählen:


- a. Probenkennung: **Probennamen** über die Tastatur eingeben
- b. Matrix: Aus dem Dropdown-Menü „**Other**“ (Sonstige) auswählen
- c. Anfrage: Aus dem Dropdown-Menü „**Generic**“ (Allgemein) auswählen
- d. Volumen (ml): Aus dem Dropdown-Menü „**0,200**“ auswählen.
- e. Eluat (µl): Aus dem Dropdown-Menü „**50**“ auswählen
- f. Typ: Primär
- g. Priorität: Normal

4. Nach Drücken der Schaltfläche „Save“ (Speichern)  erscheint die Probe im Fenster „Unassigned Sample“ (Nicht zugeordnete Probe) auf der linken Bildschirmseite. Die Schaltfläche „Enter New Extraction Request“ (Neue Extraktionsanfrage eingeben)  drücken und diesen Vorgang für weitere Proben wiederholen. Alternativ können mehrere Proben durch Drücken der Schaltfläche „Auto Create New Extraction Requests“ (Neue Extraktionsanfragen automatisch erstellen)  eingegeben werden.
5. Nach Erstellen aller Proben, zu „Organize Runs“ (Läufe organisieren) gehen, indem auf das Symbol  am oberen Bildschirmrand geklickt wird. Einen Lauf durch Drücken der Schaltfläche „Create Run“ (Lauf erstellen)  erstellen. Einen Namen für den Lauf eingeben oder den Standardnamen verwenden.
6. Einem Lauf werden Proben durch Verwenden der Schaltfläche „Auto Fill Run“ (Lauf automatisch befüllen) hinzugefügt (automatische Befüllung mit bis zu 24 Proben aus der „Unassigned Sample list“ (Liste der nicht zugeordneten Proben) auf der linken Bildschirmseite).  Alternativ können einzelne Proben mithilfe der Rechts-/Links-„Positioning icons“ (Positionierungssymbole)   nach Auswahl der entsprechenden Probe einem Lauf hinzugefügt bzw. entnommen werden. Die Probensortierung innerhalb eines Laufs kann über die Schaltflächen „Move Extraction Request Up/Down“ (Extraktionsanfrage auf-/abbewegen)   geändert werden.
7. 1 bis 3 (für 8 bis 24 Proben) Probengefäß(e) verwenden und in jede verwendete Probenvertiefung 20 µl Prozesskontrolle geben.
8. 180 µl jeder Probe in die entsprechende Vertiefung geben.
9. „Load Run“ (Lauf laden) durch Drücken der Schaltfläche  am oberen Rand des Bildschirms aufrufen. Spitzen und Probengefäß(e) in das Gerät geben.
10. Barcode(s) des/der Probengefäße(s) eingeben.
11. Barcode(s) der zu verwendenden Silica-Kügelchen eingeben.
12. Gerätedeckel schließen.
13. Silica-Kügelchen den Proben wie folgt zuordnen:
- Auf das in der Darstellung unten mit der Zahl „1“ markierte Reagenzien-Symbol klicken. Die Chargennummer der Silica-Kügelchen erscheint auf dem in der Darstellung unten mit der Zahl „2“ gekennzeichneten Registerreiter.
  - Diejenigen Proben im Lauf markieren und auswählen, denen Kügelchen zugeordnet werden müssen (in der Darstellung unten mit der Zahl „3“ gekennzeichnetes Kästchen)
  - Auf das  Positionierungssymbol (mit der Zahl „4“ in der Darstellung unten gekennzeichnet) klicken, um die Silica-Chargennummer den ausgewählten Proben zuzuordnen.

- d. Wenn das Kügelchen-Symbol rechts neben der Zahl „5“ in der Darstellung unten ausgewählt ist, sollte die Chargennummer der Silica-Kügelchen für jede Probe angezeigt werden.




14. Arbeitsliste drucken, indem zuerst auf das Symbol „Load Run“ (Lauf laden) und anschließend auf das Symbol

„Print Work List“ (Arbeitsliste drucken)  gedrückt wird.

15. Die Schaltfläche „Dispense Lysis“ (Lyse ausgeben)  drücken. Die Lyse im Gerät dauert ca. 12 Minuten.

16. Für jedes Probengefäß magnetische Partikel mithilfe der Biohit-Pipette und -Spitzen für bis zu acht Reaktionen wie folgt vorbereiten:

- Mit 1 Spitze und Programm 1, 550 µl nucleasereifes Wasser aspirieren und in ein 1,5-ml-DNAse-/RNase-freies Microfuge-Röhrchen geben.
- Magnetisches Silica vortexen. Mit 1 Spitze und Programm 1, 550 µl magnetisches Silica aspirieren, in das Wasser abgeben und durch Vortexen vermischen.
- Mit 1 Spitze und Programm 2, 1050 µl der magnetischen Silica-Mischung aspirieren und 25 µl zurück in dasselbe Röhrchen abgeben.
- Je 125 µl magnetische Silica-Mischung in 8 Vertiefungen einer ELISA-Streifenplatte geben. Spitze entsorgen.
- Nach Abschluss der Lyse (BITTE BEACHTEN: der „Instrument Status“ [Gerätstatus] am unteren Rand des Bildschirms muss „IDLE“ [inaktiv] anzeigen), unter Verwendung von 8 Spitzen und Programm 3, 100 µl magnetische Silica-Mischung in Streifenvertiefungen aspirieren, 100 µl magnetische Silica-Mischung in die Streifenvertiefungen geben und 100 µl magnetische Silica-Mischung in den Streifenvertiefungen aspirieren.
- Spitzen in die Flüssigkeit in den Probengefäßen eintauchen. 800 µl aspirieren und anschließend 900 µl magnetische Silica-Mischung zurück in das Gefäß geben. 1000 µl magnetische Silica-Mischung aus dem Gefäß aspirieren und 1000 µl des magnetischen Silica zurück in das Gefäß geben. Das Aspirieren/Abgeben von 1000 µl zwei weitere Male wiederholen.

17. Das Gerät schließen und die Schaltfläche „Start“  drücken, um den Lauf zu starten.

18. Nach Abschluss des Durchlaufs die gereinigte Nukleinsäure in nukleinsäurefreie Röhrchen geben. Eluate aus dem NucliSENS easyMAG können 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C), 8 Stunden bei 2 °C bis 8 °C und einen Monat bei -20 °C bis -70 °C gelagert werden.

## ASSAY-VERFAHREN

Die folgenden Verfahren bei einer kontrollierten Raumtemperatur von 20 °C bis 25 °C durchführen.

### Verfahren zum Rehydrieren des Mastermix

- Die Anzahl der extrahierten Proben, die getestet werden sollen bestimmen und die richtige Anzahl von Fläschchen mit lyophilisiertem Mastermix für acht Tests für die Tests bereitstellen.
- Nicht verwendete Reagenzien wieder den ordnungsgemäßen Lagerbedingungen zuführen.
- Mastermix vorsichtig öffnen, um einen Zerfall des Pellets zu vermeiden.
- In den Mastermix 135 µl Rehydrierungslösung geben.



5. Das Pellet im Fläschchen 1–2 Minuten bei Raumtemperatur rehydrieren lassen.
6. Vor dem Dispensieren in die erste Testplattenvertiefung oder das erste Reagenzröhrchen vorsichtig 2–3 Mal hoch- und runterpipettieren und dabei die Bildung von Bläschen vermeiden.

**Hinweis:** Der rehydrierte Mastermix ist ausreichend für 8 Reaktionen.

**Hinweis:** Der rehydrierte Mastermix kann bis zu 24 Stunden lang bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung von bis zu 14 Tagen muss der rehydrierte Mastermix wieder verschlossen, mit Parafilm versiegelt und in aufrechter Position bei  $\leq -20$  °C gelagert werden. Den Mastermix während der Lagerung vor Licht schützen.

## RT-PCR Einrichtungsverfahren

1. Jeder Testplattenvertiefung oder jedem Reagenzröhrchen jeweils 15  $\mu$ l rehydrierten Mastermix zufügen.
2. Anschließend 5  $\mu$ l extrahierte Nukleinsäure (Probe mit Prozesskontrolle) in die Testplattenvertiefung oder das Reagenzröhrchen geben. Das Mischen der Reagenzien ist nicht erforderlich.

**Hinweis:** Für jede extrahierte Probe eine neue Barriere-Mikropipettenspitze verwenden.

3. Die Testplatte oder die Reagenzröhrchen versiegeln.
4. Die Testplatte oder Reagenzröhrchen mindestens 15 Sekunden zentrifugieren. Sicherstellen, dass sich sämtliche Flüssigkeit am Boden der Plattenvertiefungen oder Röhrchen befindet.
5. Den entsprechenden Thermocycler einschalten.
6. Platte oder Röhrchen in den entsprechenden Thermocycler geben.

**Hinweis:** Spezifische Programmier- und Testprotokolle für jeden Thermocycler finden Sie im Anhang (Seite 20).

## QUALITÄTSKONTROLLE

Der Lyra SARS-CoV-2-Assay beinhaltet verschiedene Kontrollen, um die Leistung des Assays zu überwachen.

1. Die **Prozesskontrolle (PRC)** besteht aus einem inaktivierten und stabilisierten MS2-Bakteriophagen, der ein RNA-Genom enthält. Sie muss während der Extraktion und der Amplifizierung im Assay verwendet werden. Diese Kontrolle muss jedem Probenaliquot vor der Extraktion hinzugefügt werden. Die PRC dient der Überwachung von Hemmern in der extrahierten Probe, stellt sicher, dass eine angemessene Amplifikation stattgefunden hat und bestätigt, dass die Nukleinsäure-Extraktion ausreichend war.
2. Die **Positivkontrolle** (mit synthetischer SARS-CoV-2-RNA, Artikel M5153) muss als Patientenprobe behandelt werden und in jeden Extraktions- und RT-PCR-Lauf mit einbezogen werden.
3. Die **Negativkontrolle** (Artikel M5275) muss als Patientenprobe behandelt werden und in jeden Extraktions- und RT-PCR-Lauf mit einbezogen werden.
4. Eine fehlgeschlagene **Positiv-** oder **Negativkontrolle** macht den RT-PCR-Lauf ungültig und die Ergebnisse dürfen nicht gemeldet werden. Der RT-PCR-Lauf muss zuerst mit den extrahierten Kontrollen und Proben wiederholt werden. Ein weiteres Aliquot aus den Kontrollen und Proben extrahieren und testen oder neue Proben gewinnen und diese erneut testen, falls die Kontrollen erneut fehlschlagen.

Erwartete Ergebnisse von den Kontrollen (Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q oder Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro)					
Kontrolltyp/Name	Zur Überprüfung	SARS-CoV-2	Erwartete Ct-Werte	PRC	Erwartete Ct-Werte
<b>Positivkontrolle</b>	Grundlegendes Versagen der Reagenzien inklusive Primer- und Probenintegrität	+	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	+/-	NA <sup>1</sup>
<b>Negativkontrolle</b>	Kontamination der Reagenzien und/oder der Umgebung	-	Nicht nachgewiesen	+	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$

<sup>1</sup>Für die Prozesskontrolle ist für eine positive Kennzeichnung kein Ct-Wert erforderlich.

Erwartete Ergebnisse von den Kontrollen (Roche LightCycler 480)					
Kontrolltyp/Name	Zur Überprüfung	SARS-CoV-2	Erwartete Ct-Werte	PRC	Erwartete Ct-Werte
<b>Positivkontrolle</b>	Grundlegendes Versagen der Reagenzien inklusive Primer- und Probenintegrität	+	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	+/-	NA <sup>1</sup>
<b>Negativkontrolle</b>	Kontamination der Reagenzien und/oder der Umgebung	-	Nicht nachgewiesen	+	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$

<sup>1</sup>Für die Prozesskontrolle ist für eine positive Kennzeichnung kein Ct-Wert erforderlich.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE VON PATIENTENPROBEN

**Tabelle 4. Auswertung der Ergebnisse des Lyra SARS-CoV-2 Assays unter Verwendung von Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad CFX96 Touch, Qiagen Rotor-Gene Q oder Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro**

Assay-Ergebnis	Detektor: SARS-CoV-2	Detektor: Prozesskontrolle	Auswertung der Ergebnisse	Anmerkungen und spezielle Anweisungen
Negativ	Kein Ct nachgewiesen	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	Keine SARS-CoV-2-Virus-RNA nachgewiesen; PRC nachgewiesen.	
SARS-CoV-2-positiv	$5,0 \leq Ct \leq 30,0^1$	NA <sup>2</sup>	Virale RNA des SARS-CoV-2-Virus nachgewiesen.	
Ungültig	Kein Ct nachgewiesen	Kein Ct nachgewiesen	Keine SARS-CoV-2-Virus-RNA und keine PRC-RNA nachgewiesen.	Ungültiger Test. Dieselbe gereinigte Probe erneut testen. Wenn dieser Test ebenfalls ungültig ist, ein weiteres Aliquot derselben Probe extrahieren und testen oder eine neue Probe entnehmen und erneut testen.

### Auswertung der Ergebnisse des Lyra SARS-CoV-2 Assays unter Verwendung von Roche LightCycler 480

Assay-Ergebnis	Detektor: SARS-CoV-2	Detektor: Prozesskontrolle	Auswertung der Ergebnisse	Anmerkungen und spezielle Anweisungen
Negativ	Kein Ct nachgewiesen	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	Keine SARS-CoV-2-Virus-RNA nachgewiesen; PRC nachgewiesen.	
SARS-CoV-2-positiv	$5,0 \leq Ct \leq 40,0^1$	NA <sup>2</sup>	Virale RNA des SARS-CoV-2-Virus nachgewiesen.	
Ungültig	Kein Ct nachgewiesen	Kein Ct nachgewiesen	Keine SARS-CoV-2-Virus-RNA und keine PRC-RNA nachgewiesen.	Ungültiger Test. Dieselbe gereinigte Probe erneut testen. Wenn dieser Test ebenfalls ungültig ist, ein weiteres Aliquot derselben Probe extrahieren und testen oder eine neue Probe entnehmen und erneut testen.

<sup>1</sup> Für Proben, die einen Ct-Wert zwischen 0 (unbestimmt) und 5 erzeugen, unter Verwendung von inokuliertem Transportmedium Verdünnungen von 1:10 und 1:100 anfertigen. Die verdünnten Proben gemäß den oben stehenden Anweisungen extrahieren und testen. Die Ergebnisse gemäß Tabelle 4 oben auswerten. Bitte beachten: Wenn die Prüfung der ursprünglichen Amplifikationskurve aus der unverdünnten Probe nicht auf ein positives Ergebnis hindeutet, kann die Verarbeitung der verdünnten Proben aufgeschoben werden. Für Proben, die einen Ct-Wert zwischen 0 (unbestimmt) und 5 erzeugen, wenden Sie sich bitte an einen Vertreter von Quidel unter +1 800 874 1517 (gebührenfrei in den USA) oder +1 858 552 1100 (außerhalb der Vereinigten Staaten), jeweils Montag bis Freitag zwischen 08.00 und 17.00 Uhr, US-Ostküstenzeit, um weitere Anweisungen zu erhalten.

<sup>2</sup> Damit die Prozesskontrolle ein positives Ergebnis zeigt, ist kein Ct-Wert erforderlich.

## KLINISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT

Die klinische Leistungsfähigkeit des Lyra SARS-CoV-2-Assays wurde in zwei (2) verschiedenen Studien evaluiert:

- In einer Studie wurden 265 frische oder gefrorene in UTM entnommene Nasenrachenabstrichproben (36 bzw. 229) von Patienten aus den USA verwendet
- Eine umfassende Studie mit künstlich hergestellten positiven Proben unter Verwendung von Nasenrachenabstrichen.

Alle zweihundertfünfundsechzig (265) Proben waren negativ für SARS-CoV-2, als sie mit dem NucliSENS easyMAG System extrahiert und mit dem Lyra SARS-CoV-2-Assay getestet wurden.

124 in diese Studie eingeschlossene Proben waren positiv für andere zirkulierende Atemwegsviren, die durch von der FDA genehmigte Assays identifiziert wurden:

Zirkulierendes Virus	Anzahl der positiven Proben
Influenza A	30
RSV	4
Coronavirus saisonal (nicht identifiziert)	10
Coronavirus 229e	20
Coronavirus OC43	20
Coronavirus NL63	20
Coronavirus HKU1	20

Für die klinische Studie mit den künstlich hergestellten Proben wurde die virale RNA von BEI Resources erlangt. Die genomische RNA wurde mit dem Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen 52904) aus einer Zellysatpräparation und Überstand von mit SARS-verbundenen Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infizierten Nierenepithelzellen von Cercopithecus aethiops (Vero E6, ATCC® CRL-1586™) und Isolat USA-WA1/2020 extrahiert. Die virale genomische RNA befindet sich in einem Hintergrund aus zellulärer Nukleinsäure und Träger-RNA. Die Genomkopiennummer wurde mit dem Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™) System ermittelt.

Zweiundneunzig (92) positive Proben wurden hergestellt, indem zweiundneunzig (92) individuelle klinische Proben, die zuvor mit dem Lyra-SARS-CoV-2-Assay negativ auf SARS-CoV-2 getestet worden waren, mit einer von drei Konzentrationen der genomischen SARS-CoV-2-RNA gespickt wurden. Vierundvierzig (44) Proben wurden mit 1x LoD (8,00E-01 cp/µl) RNA gespickt. Vierundzwanzig (24) zusätzliche Proben wurden mit 3x LoD (2,40E00 cp/µl) RNA gespickt. Vierundzwanzig (24) zusätzliche Proben wurden mit 5x LoD (4,00E00 cp/µl) RNA gespickt. Alle Proben wurden gemäß der Packungsbeilage des Lyra SARS-CoV-2-Assay extrahiert und getestet.

Alle zweiundneunzig (92) künstlich hergestellten Proben waren im Lyra SARS-CoV-2-Assay positiv. Die Ergebnisse für die künstlich hergestellten positiven Proben sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Klinische Bewertung von geimpften Nasenrachenabstrichproben			
Konzentration der Proben-RNA	Anz. positive/Anz. getestete	Mittlerer SARS-CoV-2 Ct	% CV
nicht gespickt	0/92	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar
1x LoD	44/44	26,9	5,7
3 x LOD	24/24	22,8	3,4
5 x LOD	24/24	22,4	3,0

Leistung im Vergleich zu den erwarteten Ergebnissen:

Positive prozentuale Übereinstimmung: 92/92 = 100 % (95 % KI: 95,99 %–100 %)

Negative prozentuale Übereinstimmung: 92/92 = 100 % (95 % KI: 95,99 %–100 %)

## ANALYTISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) des Lyra-SARS-CoV-2-Assays verwendete Grenzverdünnungen genomischer SARS-CoV-2-RNA in negativer nasopharyngealer Matrix. Jede Verdünnung wurde mit dem NucliSENS easyMAG-System extrahiert

und im Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch oder Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro getestet. Die analytische Sensitivität (LoD; limit of detection) ist als die tiefste Konzentration definiert, bei der mindestens 95 % aller Wiederholungen positiv getestet werden.

Die genomische RNA wurde mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 52904) aus einer Zellsatpräparation und Überstand von mit SARS-verwandten Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infizierten Nierenepithelzellen von Cercopithecus aethiops (Vero E6, ATCC CRL-1586) und Isolat USA-WA1/2020 extrahiert. Die virale genomische RNA befindet sich in einem Hintergrund aus zellulärer Nukleinsäure und Träger-RNA. Die Genomkopiennummer wurde mit dem Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR)-System ermittelt.

Mit dieser Studie wurde die LOD für den Lyra-SARS-CoV-2-Assay auf 8,00E-01 genomische RNA-Kopien/ $\mu$ l festgesetzt, und anschließend durch testen von 20 Replikaten bestätigt.

<b>LOD bei Nasenrachenproben mit Applied Biosystems 7500 Fast Dx</b>				
<b>Konzentration</b>	<b>Replikat</b>	<b>SARS-CoV-2 C<sub>t</sub></b>	<b>PRC C<sub>t</sub></b>	<b>Auswertung</b>
8.00E-01 genomische RNA Kopien/ $\mu$ l	1	23,95	18,54	Positiv
	2	26,59	18,28	Positiv
	3	26,19	18,32	Positiv
	4	25,13	18,41	Positiv
	5	24,88	18,74	Positiv
	6	24,84	19,18	Positiv
	7	25,51	18,82	Positiv
	8	25,20	18,58	Positiv
	9	24,69	18,71	Positiv
	10	24,57	18,67	Positiv
	11	23,86	18,75	Positiv
	12	24,58	18,91	Positiv
	13	25,19	19,03	Positiv
	14	25,84	19,05	Positiv
	15	26,58	19,10	Positiv
	16	26,72	19,15	Positiv
	17	24,16	19,06	Positiv
	18	25,15	18,91	Positiv
	19	25,51	19,05	Positiv
	20	24,41	19,07	Positiv

<b>LoD bei Mundrachenproben mit Applied Biosystems 7500 Fast Dx</b>				
<b>Konzentration</b>	<b>Replikat</b>	<b>SARS-CoV-2 C<sub>t</sub></b>	<b>PRC C<sub>t</sub></b>	<b>Auswertung</b>
8.00E-01 genomische RNA Kopien/ $\mu$ l	1	27,26	19,38	Positiv
	2	28,99	19,22	Positiv
	3	27,3	19,51	Positiv
	4	26,09	19,27	Positiv
	5	26,88	19,61	Positiv
	6	26,02	19,19	Positiv
	7	26,37	19,21	Positiv
	8	25,01	19,30	Positiv
	9	25,14	19,06	Positiv
	10	26,21	19,03	Positiv
	11	27,79	19,27	Positiv
	12	28,83	19,12	Positiv
	13	28,83	19,19	Positiv
	14	26,81	19,50	Positiv
	15	25,1	19,30	Positiv
	16	26,2	19,11	Positiv

LoD bei Mundrachenproben mit Applied Biosystems 7500 Fast Dx				
Konzentration	Replik	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
	17	26,74	19,00	Positiv
	18	25,28	19,13	Positiv
	19	26,27	19,31	Positiv
	20	26,37	19,24	Positiv

LoD bei Nasenrachenproben mit Applied Biosystems 7500 Standard				
Konzentration	Replik	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
8.00E-01 genomische RNA Kopien/μl	1	26,63	19,26	Positiv
	2	29,15	19,28	Positiv
	3	25,67	19,69	Positiv
	4	25,53	20,07	Positiv
	5	26,15	20,50	Positiv
	6	26,71	20,50	Positiv
	7	26,11	19,14	Positiv
	8	26,94	19,18	Positiv
	9	25,62	18,64	Positiv
	10	25,80	18,80	Positiv
	11	26,76	19,15	Positiv
	12	26,15	19,63	Positiv
	13	27,42	19,44	Positiv
	14	27,51	19,99	Positiv
	15	26,07	19,9	Positiv
	16	25,92	18,81	Positiv
	17	27,95	20,02	Positiv
	18	27,71	19,27	Positiv
	19	26,51	18,86	Positiv
	20	Unbestimmt	19,11	Negativ

LoD bei Nasenrachenproben mit Roche LightCycler 480*				
Konzentration	Replik	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
8.00E-01 genomische RNA Kopien/μl	1	32,91	31,73	Positiv
	2	34,54	32,9	Positiv
	3	34,83	32,25	Positiv
	4	34,94	31,7	Positiv
	5	33,81	32,14	Positiv
	6	34,36	32,37	Positiv
	7	33,90	32,10	Positiv
	8	33,83	32,80	Positiv
	9	33,8	31,86	Positiv
	10	34,28	32,27	Positiv
	11	33,63	32,81	Positiv
	12	33,72	32,45	Positiv
	13	34,86	33,17	Positiv
	14	34,57	32,64	Positiv
	15	34,48	32,92	Positiv
	16	33,61	32,82	Positiv
	17	33,87	33,34	Positiv
	18	34,44	33,36	Positiv
	19	34,22	32,55	Positiv
	20	33,77	32,97	Positiv

\* Die Ergebnisse umfassen 10 Zyklen, die von den anderen Geräten nicht aufgezeichnet wurden.

LoD in Nasenrachenproben mit Qiagen Rotor-Gene Q				
Konzentration	Replikat	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
8.00E-01 genomische RNA Kopien/ $\mu$ l	1	24,01	19,08	Positiv
	2	24,04	19,36	Positiv
	3	24,85	19,44	Positiv
	4	23,23	19,13	Positiv
	5	24,39	19,07	Positiv
	6	23,89	18,94	Positiv
	7	23,78	18,80	Positiv
	8	24,82	18,86	Positiv
	9	23,87	18,83	Positiv
	10	24,05	18,90	Positiv
	11	23,28	18,84	Positiv
	12	24,36	18,71	Positiv
	13	23,85	18,87	Positiv
	14	23,54	18,88	Positiv
	15	24,84	19,20	Positiv
	16	23,63	19,01	Positiv
	17	24,18	18,97	Positiv
	18	23,47	19,01	Positiv
	19	23,58	18,94	Positiv
	20	23,89	19,02	Positiv

LoD in Nasenrachenproben mit Bio-Rad CFX96 Touch				
Konzentration	Replikat	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
8.00E-01 genomische RNA Kopien/ $\mu$ l	1	27,19	21,25	Positiv
	2	25,57	21,35	Positiv
	3	25,80	22,68	Positiv
	4	27,93	21,3	Positiv
	5	29,03	21,09	Positiv
	6	25,79	21,45	Positiv
	7	25,65	21,19	Positiv
	8	26,26	21,16	Positiv
	9	29,46	21,41	Positiv
	10	25,09	21,45	Positiv
	11	25,68	21,36	Positiv
	12	28,51	21,49	Positiv
	13	25,5	21,97	Positiv
	14	26,81	21,36	Positiv
	15	26,17	21,1	Positiv
	16	25,04	21,91	Positiv
	17	25,47	22,08	Positiv
	18	25,54	21,26	Positiv
	19	25,77	22,29	Positiv
	20	25,59	22,16	Positiv

LoD in Nasenrachenproben mit Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Konzentration	Replikat	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
8.00E-01 genomische RNA Kopien/ $\mu$ l	1	24,25	20,21	Positiv
	2	26,7	20,9	Positiv
	3	27,14	20,6	Positiv
	4	27,28	20,81	Positiv
	5	29,60	20,78	Positiv
	6	26,99	20,65	Positiv
	7	28,75	20,82	Positiv

LoD in Nasenrachenproben mit Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro				
Konzentration	Replikat	SARS-CoV-2 C <sub>t</sub>	PRC C <sub>t</sub>	Auswertung
	8	27,63	20,76	Positiv
	9	29,80	20,65	Positiv
	10	26,60	20,55	Positiv
	11	27,23	20,54	Positiv
	12	29,81	20,73	Positiv
	13	26,59	20,88	Positiv
	14	27,23	20,87	Positiv
	15	26,63	20,62	Positiv
	16	26,07	20,84	Positiv
	17	25,14	20,81	Positiv
	18	27,34	20,6	Positiv
	19	29,22	20,67	Positiv
	20	26,37	20,38	Positiv

Der Lyra SARS-CoV-2 Assay wurde unter Verwendung des FDA SARS-CoV-2-Referenzpanels beurteilt. Die Beurteilung der Sensitivität und MERS-CoV-Kreuzreaktivität erfolgte unter Verwendung des Referenzmaterials (T1), verblindeter Proben und eines von der FDA bereitgestellten Standardprotokolls. Die Studie umfasste eine Bereichsfindungsstudie und eine Studie zur Bestätigung der LoD. Zur Feststellung der Spezifität und Bestätigung der LoD wurden Blindstichproben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Proben wurden unter Verwendung des bioMérieux NucliSENS easyMAG extrahiert und mit dem Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro amplifiziert und nachgewiesen.

Übersicht der Ergebnisse der LoD-Bestätigung unter Verwendung des SARS-CoV-2-Referenzpanels der FDA			
Von der FDA zur Verfügung gestellte Referenzmaterialien	Probentyp	LoD des Produkts	Kreuzreaktivität
SARS-CoV-2	NPS	6,0 x 10 <sup>3</sup> NDU/ml	n. z.
MERS-CoV		n. z.	n. n.

NDU/ml: RNA NAAT nachweisbare Einheiten/ml

n. z.: nicht zutreffend

n. n.: nicht nachgewiesen

## ANALYTISCHE REAKTIVITÄT (INKLUSIVITÄT)

Die Inklusivität des Lyra SARS-CoV-2 Assay wurde durch das Testen genomischer RNA vom SARS-varianten Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), Isolat USA-WA1/2020, über eine *In-silico*-Analyse festgestellt.

Die *In-silico*-Analyse zeigte, dass die Lyra SARS-CoV-2-Primer zu >95 % in 41.270 bzw. 301.386 SARS-CoV-2-Sequenzen konserviert sind, die bei NCBI (17. Dezember 2020) bzw. GISAID (30. Dezember 2020) zur Verfügung stehen.

Mit Stand vom 30. Dezember 2020 hatte GISAID 4.529 Sequenzen der UK-Variante VU1 202012/01 und der südafrikanischen Variante 501Y.V2. Die *In-silico*-Analyse zeigte, dass die Lyra SARS-CoV-2-Primer >95 % homolog zu diesen Varianten sind. 5 UK-Varianten haben einen SNP, der mit dem 3'-Ende ausgerichtet war. Eine RNA-Sequenz, die eine UK-Variante mit dem SNP repräsentiert, und eine, die eine Kontrollsequenz (MN908947.3) repräsentiert, wurden bestellt und mit dem Lyra SARS-CoV-2 Assay getestet. Beide RNA-Vorlagen lieferten ähnliche Ergebnisse, was zeigt, dass der mit dem 3'-Ende ausgerichtete SNP den Nachweis nicht beeinträchtigt. Das Ergebnis korreliert mit den vorausgegangenen Studien über mit dem 3'-Ende des Lyra-Primer ausgerichtete SNPs.

Die Lyra SARS-CoV-2-Primer sind zu 95-100 % in 342.656 SARS-CoV-2-Sequenzen konserviert, die seit dem 30. Dezember 2020 bei NCBI und GISAID zur Verfügung stehen.

## ANALYTISCHE SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die analytische Spezifität des Assays wurde sowohl durch die direkte Testung von Organismen mit dem Assay („Wet Testing“) und durch die *In-silico*-Analyse bestimmt. Beim „Wet Testing“ wurden 25 Mikroorganismen in hohen Konzentrationen verwendet, die von der FDA für die Evaluierung mit hoher Priorität eingestuft wurden, da sie mit

hoher Wahrscheinlichkeit in den Proben der oberen Atemwege vorhanden sind. Alle Mikroorganismen waren im „Wet Testing“ mit dem Lyra SARS-CoV-2-Assay nicht nachweisbar, wie unten gezeigt.

Testergebnisse zur Kreuzreaktivität				
Virus/Bakterien/Parasiten	Stamm	Herkunft/ Probentyp	Konzentration	Ergebnisse
Adenovirus	Typ 1	Isolat	1 x 10 <sup>7,53</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Coronavirus	229e	Isolat	1 x 10 <sup>6,10</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Coronavirus	OC43	Isolat	9,55 x 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg., Neg., Neg.
Coronavirus	NL63	Isolat	1 x 10 <sup>4,67</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
MERS-CoV (hitzeinaktiviert)	Florida/USA-2 Saudiarabien 2014	Isolat	4,17 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg., Neg., Neg.
SARS -1	2003-00592	Inaktiviertes Virus	Nicht verfügbar	Neg., Neg., Neg.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129	Isolat	3 x 10 <sup>7</sup> CCU/ml	Neg., Neg., Neg.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Z018	Isolat	3,8 x 10 <sup>9</sup> KBE/ml	Neg., Neg., Neg.
Influenza A H3N2	Brisbane/10/07	Isolat	1 x 10 <sup>5,07</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Influenza A H1N1	New Caledonia/20/99	Isolat	1 x 10 <sup>6,66</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Influenza B	Brisbane/33/08	Isolat	1 x 10 <sup>5,15</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Parainfluenza	Typ 1	Isolat	1 x 10 <sup>8,01</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Parainfluenza	Typ 2	Isolat	1 x 10 <sup>6,34</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Parainfluenza	Typ 3	Isolat	8,51 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg., Neg., Neg.
Parainfluenza	Typ 4b	Isolat	1 x 10 <sup>7,53</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Enterovirus	Typ 68	Isolat	1 x 10 <sup>6,5</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Humanes Metapneumovirus	A1 (IA10-s003)	Isolat	1 x 10 <sup>5,55</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Respiratorisches Syncytial-Virus	Type A (3/2015 Isolat Nr. 3)	Isolat	1 x 10 <sup>5,62</sup> U/ml	Neg., Neg., Neg.
Humanes Rhinovirus	n. z.	Inaktiviertes Virus	Nicht verfügbar	Neg., Neg., Neg.
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	AR-39	Isolat	2,9 x 10 <sup>7</sup> IFU/ml	Neg., Neg., Neg.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Typ b; Eagan	Isolat	7,87 x 10 <sup>8</sup> KBE/ml	Neg., Neg., Neg.
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia	Isolat	6,82 x 10 <sup>9</sup> KBE/ml	Neg., Neg., Neg.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022; 19f	Isolat	2,26 x 10 <sup>9</sup> KBE/ml	Neg., Neg., Neg.
<i>Bordetella pertussis</i>		Isolat		Neg., Neg., Neg.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> -S. cerevisiae Rekombinant	W303-Pji	Isolat	1,56 x 10 <sup>8</sup> KBE/ml	Neg., Neg., Neg.
Negative nasopharyngeale Matrix	MTM	n. z.	n. z.	Neg., Neg., Neg.
Negative nasopharyngeale Matrix	MTM	n. z.	n. z.	Neg., Neg., Neg.
Negative nasale Matrix	CDC Virustransport	n. z.	n. z.	Neg., Neg., Neg.
Negative oropharyngeale Matrix	CDC Virustransport	n. z.	n. z.	Neg., Neg., Neg.

Die *In-silico*-Analyse war auf zweiunddreißig (32) Mikroorganismen begrenzt, die aufgrund ihres möglichen Vorhandenseins in Proben der oberen Atemwege von der FDA mit hoher Priorität eingestuft wurden.

Kreuzreaktivität-Organismen			
Organismus	Gesamtzahl Sequenzen	Anzahl komplette Genome	Anzahl WGS Stämme
Adenovirus	532	532	0
Coronavirus (saisonal)	288	288	0
Enterovirus <sup>B</sup>	2.708	2.674	34
Influenza A Virus <sup>A B</sup>	172.455	21444 (+39 A/Mexiko/4108/2009)	108
Influenza B Virus <sup>A B</sup>	53.952	6755 (+16 B/Florida/4/2006)	0



Kreuzreaktivität-Organismen			
Organismus	Gesamtzahl Sequenzen	Anzahl komplette Genome	Anzahl WGS Stämme
Influenza C Virus <sup>B</sup>	2.205	n. z.	n. z.
Humanes Metapneumovirus	145	145	0
Humanes Parainfluenzavirus 1–4	439	439	0
Humanes Parechovirus	124	124	0
Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus <sup>B</sup>	1.275	1.275	0
Rhinovirus	214	214	0
SARS-1	236 <sup>C</sup>	232 (+4 pp1ab Sequenzen)	0
<i>Bacillus anthracis</i>	4.152	69	86
<i>Candida albicans</i>	1.541	59	34
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	466	5	20
<i>Chlamydia psittaci</i>	11.179	23	45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	20.797	17	194
<i>Coxiella burnetii</i>	419	28	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	45.267	61	692
Legionella <sup>B</sup>	4.843	98	65
Leptospira <sup>B</sup>	64.456	133	266
<i>Moraxella catarrhalis</i> <sup>B</sup>	8.333	11	184
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	194	194	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	808	51	45
<i>Neisseria elongata</i> und <i>N. meningitidis</i> <sup>B</sup>	312.050	116	1.318
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	487	15	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	195	195	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	634	634	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <sup>B</sup>	61.880	23	508
<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>B</sup>	1.633.369	107	8.526
<i>Streptococcus pyogenes</i> <sup>B</sup>	46.153	201	1.733
<i>Streptococcus salivarius</i> <sup>B</sup>	9.417	18	48

<sup>A</sup> Genomzahlen für Influenza A und Influenza B wurden für Stämme erhalten, die alle 8 Segmente beinhalteten, außer für A/Mexico/4108/2009(H1N1) und B/Florida/4/2006; alle verfügbaren Gensequenzen wurden eingeschlossen.

<sup>B</sup> Für BLAST wurden „Max Target Seqs“ (maximale Zielsequenzen) auf 5.000 eingestellt.

<sup>C</sup> 4 Polyprotein-Codon-Sequenzen wurden auch eingeschlossen.

Die *In-silico*-Analyse zeigte eine < 80 %-ige Homologie mit allen Organismen außer bei den folgenden: Drei (3) Enterovirus-Sequenzen sind 80,9 % homolog mit dem Reversprimer, der Vorwärtsprimer ist jedoch nur 76 % homolog und das Alignment der Probe zeigte eine generelle Homologie von 56 %. Die SARS-1 Sequenzen sind ≥ 80 % mit beiden Primern homolog, jedoch ist die letzte Base an den 3'-Enden beider Primer nicht homolog. Im „Wet Testing“ war der einzig verfügbare SARS-1-Stamm nicht nachweisbar.

## EINSCHRÄNKUNGEN

- Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und dürfen nicht alleinige Basis für Entscheidungen zur Patientenbehandlung sein.
- Dieser Test ist für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in Nasenrachen- und Mundrachenabstrichproben vorgesehen. Das Testen anderer Probenotypen kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Nasenabstriche und Nasenabstriche aus der mittleren Nasenmuschel gelten als akzeptable Probenotypen für die Verwendung mit dem Lyra-SARS-CoV-2-Assay, aber die Leistung mit diesen Probenotypen wurde noch nicht nachgewiesen. Das Testen von Nasenabstrichen und Nasenabstrichen aus der mittleren Nasenmuschel (selbst unter Aufsicht eines Gesundheitsdienstleisters oder von diesem entnommen) ist auf Patienten mit COVID-19-Symptomen beschränkt.
- Fehler bei Entnahme, Lagerung oder dem Transport von Proben können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

- In der Probe vorhandene Inhibitoren und/oder Fehler im Befolgen des Assay-Verfahrens können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
- Assay-Ergebnisse müssen von einer ausgebildeten Medizinfachperson in Kombination mit der Krankengeschichte, klinischen Zeichen und Symptomen und den Ergebnissen anderer diagnostischer Tests des Patienten interpretiert werden.
- Analyt-Ziele (virale Sequenzen) können *in vivo* unabhängig von der Lebensfähigkeit des Virus weiterbestehen. Die Entdeckung von (einem) Analyt-Ziel(en) bedeutet weder, dass ein entsprechender Virus/entsprechende Viren infektiös ist/sind, noch dass sie die Erreger für klinische Symptome sind.
- Es besteht das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination durch Zielorganismen, ihren Nukleinsäuren oder ihrem amplifizierten Produkt oder durch nicht-spezifische Signale im Assay.
- Es besteht ein Risiko von falsch-negativen Werten aufgrund des Vorhandenseins von Sequenzvarianten in den viralen Zielen des Assays.
- Die Leistung des Assays bei immungeschwächten Patienten wurde nicht untersucht.
- Die Leistungsfähigkeit des Produkts wurde an Proben von Personen beurteilt, die mit neu auftretenden Varianten von SARS-CoV-2, die für die öffentliche Gesundheit bedenklich sind, infiziert waren.

## KUNDENSERVICE UND TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Wenn Sie Fragen zur Verwendung dieses Produkts haben oder ein Problem mit einem Produkt melden möchten, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Quidel unter +1 800 874 1517 (in den USA) oder [technicalsupport@quidel.com](mailto:technicalsupport@quidel.com). Außerhalb der USA können weitere Informationen von Ihrem Vertriebshändler oder direkt von Quidel unter einer der nachstehend angegebenen Nummern eingeholt werden. Auf [quidel.com](http://quidel.com) finden Sie weitere Support-Optionen.

Land	Telefon	E-Mail-Adresse
Europa, Nahost und Afrika	+353 (91) 412 474 (Hauptrufnummer) 0 1800 200441 (gebührenfrei)	<a href="mailto:emeatechnicalsupport@quidel.com">emeatechnicalsupport@quidel.com</a>
Österreich	+43 316 231239	
Belgien	+32 (2) 793 0180	
Frankreich	0 (805) 371674	
Deutschland	+49 (0) 7154 1593912	
Niederlande	0 800 0224198	
Schweiz	0 800 554864	
Vereinigtes Königreich	0 800 3688248	
Irland	+353 (91) 412 474	
Italien	+39 (800) 620 549	
Nordamerika, Asien-Pazifik, Lateinamerika	858 552 1100	<a href="mailto:technicalsupport@quidel.com">technicalsupport@quidel.com</a>
Kanada	(437) 266-1704 (Hauptrufnummer) (888) 415-8764 (gebührenfrei)	<a href="mailto:technicalsupport@quidel.com">technicalsupport@quidel.com</a>
China	0400 920 9366 oder +86 021 3217 8300	<a href="mailto:chinatechnicalservice@quidel.com">chinatechnicalservice@quidel.com</a>

## GEISTIGES EIGENTUM

Farbstoffpräparate in diesem Produkt werden unter Lizenz von Biosearch Technologies, Inc. vertrieben und sind durch bestehende oder angemeldete US-amerikanische und weltweite Patente geschützt.

Quidel und Lyra sind eingetragene Marken der Quidel Corporation. Alle anderen in diesem Dokument genannten Marken befinden sich im Besitz der jeweiligen Eigentümer und ihre Nutzung in diesem Dokument bedeutet nicht, dass ein Produkt oder Services gesponsert oder empfohlen werden.

## LITERATUR

1. Baker, S., Frias, L., and Bendix, A. Coronavirus live updates: More than 92,000 people have been infected and at least 3,100 have died. The US has reported 6 deaths. Here's everything we know. Business Insider. 3. März 2020.
  2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. CLSI-Dokument M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
  3. Lauer, S.A., et. al. The incubation period of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application, Ann Intern Med. 2020
  4. [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html)
-

# ANHANG (SPEZIFISCHE PROGRAMMIER- UND TESTPROTOKOLLE FÜR JEDEN THERMOCYCLER)

## Anleitung zum Programmieren von Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Weitere Informationen finden sich im Benutzerhandbuch Artikelnummer 4406991.

1. Das 7500 Fast Dx Softwarepaket starten.
2. Das Dialogfeld „**Quick Startup document**“ (Dokument-Schnellstart) öffnet sich. Die Schaltfläche „**Create New Document**“ **betätigen, um den „New Document Wizard**“ (Neues Dokument-Assistent) zu starten. Zur Aktivierung des Lyra SARS-CoV-2-Assay-Protokolls die einzelnen Schritte durchführen.

- a. **Dokument definieren:**Die meisten der folgenden Einstellungen sollten Standardeinstellungen sein. Bei Bedarf entsprechend anpassen.

- i. Die folgenden Angaben bestätigen oder eingeben.

<b>Assay:</b>	Standardkurve (Absolute Quantifikation)
<b>Gefäß:</b>	96-Vertiefungen durchsichtig
<b>Vorlage:</b>	Leeres Dokument
<b>Durchlauf-Modus:</b>	Schnell 7500
<b>Bediener:</b>	<i>Ihr Bedienername</i>
<b>Kommentare:</b>	SDS v1.4
<b>Plattenname:</b>	„Lyra SARS-CoV-2-Assay“

- ii. Die Schaltfläche „**Next**“ (Weiter) wählen.

- b. **Detektoren wählen:** Neue Detektoren für SARS-CoV-2 und die Prozesskontrolle (PRC) müssen hinzugefügt werden. Für jedes Ziel die Schaltfläche „**New Detector**“ (Neuer Detektor) wählen, um das Dialogfenster „**New Detector**“ zu öffnen. Alternativ kann im Dialogfenster „**New Detector**“ die Schaltfläche „**Create Another**“ (Weiteren erstellen) für die letzten beiden Detektoren gewählt werden.

- i. Für jeden Detektor die folgenden Informationen eingeben.

<b>Name</b>	<b>Reporterfarbstoff</b>	<b>Quencher-Farbstoff</b>	<b>Farbe</b>
SARS-CoV-2	FAM	(keine)	(wählen)
PRC	Quasar 670	(keine)	(wählen)

- ii. Für jeden Detektor eine spezifische Farbe wählen.
- iii. Die neuen Detektoren markieren und über die Schaltfläche „**Add**“ (**Hinzufügen**) der Spalte „**Detectors in Document**“ (Detektoren im Dokument) hinzufügen.
- iv. Aus dem Dropdown-Menü „**Passive Reference**“ (**Passivreferenz**) „(none)“ (keine) auswählen.
- v. Die Schaltfläche „**Next**“ (Weiter) wählen.
- vi. Die Schaltfläche „**Finish**“ (Beenden) wählen, ohne Vertiefungen festzulegen.

- c. Der Assistent wird geschlossen und die Software wird beginnend mit der Registerkarte „**Setup**“ (Setup) aktiviert. Dies ruft die Probenplatte auf, die im Rahmen des Schnellstarts eingerichtet wurde. Für die Ersteinrichtung muss hier keine Änderung vorgenommen werden.

- d. **Das Thermocycler Protokoll definieren:** Die Registerkarte „Instrument“ (Gerät) wählen, um die Lyra SARS-CoV-2-Assay RT-PCR-Zykluszeiten und -Temperaturen einzurichten. Unter „**Thermal Profile**“ (Wärmeprofil) sollte ein vordefiniertes 2-Phasen-Protokoll vorliegen. Jede Phase bietet dem Benutzer 3 editierbare Textfelder. Der obere Feldwert gibt die Anzahl an Wiederholungen oder Zyklen für diese Phase an. Der mittlere Feldwert gibt die Temperatur (°C) and und der untere Feldwert die Zeit (Minuten: Sekunden) an.

- i. Es sind die folgenden Änderungen am voreingestellten **Thermal Cycler Protokoll** vorzunehmen:

1. Phase 1

- a. Wdh.: 1
- b. Temp.: 55
- c. Zeit: 5:00

2. Den Balken zwischen Phase 1 und Phase 2 wählen. Die Schaltfläche „**Add Hold**“ (Hold hinzufügen) wählen, um eine weitere Phase hinzuzufügen.

3. Phase 2

- a. Wdh.: 1
- b. Temp.: 60
- c. Zeit: 5:00

4. Den Balken zwischen Phase 2 und Phase 3 wählen. Die Schaltfläche „**Add Hold**“ (Hold hinzufügen) wählen, um eine weitere Phase hinzuzufügen.
5. Phase 3
  - a. Wdh.: 1
  - b. Temp.: 65
  - c. Zeit:5:00
6. Phase 4 (2-stufige Dissoziationsphase)
  - a. Wdh.: 10
  - b. Schritt 1
    - i. Temp.: 92
    - ii. Zeit: 0:05
  - c. Schritt 2
    - i. Temp.: 57
    - ii. Zeit: 0:40
7. Den Balken rechts neben der Phase 4 wählen. Die Schaltfläche „**Add Cycle**“ (Zyklus hinzufügen) wählen, um eine weitere Phase hinzuzufügen.
8. Phase 5 (2-stufige Dissoziationsphase)
  - a. Wdh.: 30
  - b. Schritt 1
    - i. Temp.: 92
    - ii. Zeit: 0:05
  - c. Schritt 2
    - i. Temp.: 57
    - ii. Zeit: 0:40
9. Wenn eine falsche Phase hinzugefügt wurde, kann diese Phase durch Drücken auf die Schaltfläche „**Delete**“ (Löschen) nach Markieren der Phase zwischen den vertikalen Linien wieder entfernt werden.
- ii. Unter „**Settings**“ (Einstellungen) das Folgende eingeben:

Probenvolumen (µl):	20 (Standardeinstellung)
Durchlauf-Modus:	7500 Fast (Standardeinstellung)
Datenerhebung:	Phase 5, Schritt 2 (57,0 @ 0:40)
<b>HINWEIS: Das Kästchen neben „Expert Mode“ (Expertenmodus) darf nicht markiert werden.</b>	

- e. Für jeden Analyt einen Schwellenwert festlegen.
  - i. Die Registerkarte „**Results**“ (Ergebnisse) wählen.
  - ii. Die Registerkarte „**Amplification Plot**“ (Amplifizierungsdarstellung) wählen.
  - iii. Von der Registerkarte „Detector“ (Detektor) in der rechten oberen Ecke „SARS-CoV-2“ wählen.
  - iv. Im Block „**Analysis Settings**“ (Analyseeinstellungen), den „**Threshold**“ (Schwellenwert) auf „**7.5e+004**“ setzen.
  - v. Das Optionsfeld „**Auto Baseline**“ (Autom. Basislinie) wählen.
  - vi. Von der Registerkarte „Detector“ in der rechten oberen Ecke „PRC“ wählen.
  - vii. Im Block „**Analysis Settings**“ (Analyseeinstellungen), den „**Threshold**“ (Schwellenwert) auf „**1,0e+004**“ setzen.
  - viii. Das Optionsfeld „**Auto Baseline**“ (Autom. Basislinie) wählen.
- f. Das neue Protokoll für eine zukünftige Verwendung als Vorlage speichern.
  - i. Im oberen Teil des Bildschirms erst „**File**“ (Datei) auswählen und anschließend „**Save As**“ (Speichern als).
  - ii. **Speichern unter:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
  - iii. **Dateiname:** „Lyra SARS-CoV-2“
  - iv. **Speichern als Dateityp:** „SDS Templates (\*.sdt)“
- g. Die Software beenden.

## Applied Biosystems 7500 Fast Dx Thermocycler Testverfahren

1. Das 7500 Fast Dx Softwarepaket v1.4 starten.
2. Das Dialogfeld „**Quick Startup document**“ (Dokument-Schnellstart) öffnet sich.
3. Auf „**Create a new document**“ (Neues Dokument erstellen) klicken.

4. Die meisten der folgenden Einstellungen sollten Standardeinstellungen sein. Bei Bedarf entsprechend anpassen.

<b>Assay:</b>	Standardkurve (Absolute Quantifikation)
<b>Gefäß:</b>	96-Vertiefungen durchsichtig
<b>Vorlage:</b>	Lyra SARS-CoV-2
<b>Durchlauf-Modus:</b>	Schnell 7500
<b>Bediener:</b>	<i>Ihr Bedienername</i>
<b>Kommentare:</b>	SDS v1.4
<b>Plattenname:</b>	<b>TTMMJJ- Lyra SARS-CoV-2</b>

5. Probenplatte einrichten
- Unter den Registerkarten „**Setup**“ (**Setup**) und „**Plate**“ (Platte) erscheint das Platten-Setup.
  - Alle Vertiefungen auswählen, die eine Probe enthalten, rechtsklicken und aus dem Dropdown-Menü den „**Well Inspector**“ (Vertiefungsinspektor) wählen. Wenn sich das Dialogfenster „Well Inspector“ öffnet, die Detektoren für SARS-CoV-2 und PRC wählen.
  - Mithilfe des „**Well Inspectors**“ die Probennamen eingeben. Die Patienten-ID kann über das Well Inspector-Fenster eingegeben werden. Es wird jedoch empfohlen, dies vor dem Re-Suspendieren des lyophilisierten Mastermixes, nach dem Durchlauf oder unter Verwendung der Importierfunktion durchzuführen, um den Zeitraum zu minimieren, während dessen die PCR-Reaktionen vor dem Durchlaufstart der Raumtemperatur ausgesetzt sind.
  - Den Lauf als **TTMMJJ- Lyra SARS-CoV-2.sds** speichern.
  - Es öffnet sich ein Fenster, das nach dem „Reason for change of entry“ (Grund für die Änderung des Eintrags) fragt. „**Setup**“ (Setup) und andere für den Lauf wichtige Kommentare eingeben.
6. PCR starten
- Die Registerkarte „**Instrument**“ (Gerät) wählen.
  - Die 96-Vertiefungen-PCR-Platte in das Gerät geben.
  - Unter „**Instrument Control**“ (**Gerätesteuerung**) die **Schaltfläche „Start“** wählen, um den Lauf zu starten.
7. Nach der PCR
- WICHTIG:** Nach Abschluss des Laufs auf „OK“ drücken.
- Zur Analyse der Daten auf die Schaltfläche „**Analyze**“ (Analysieren) im oberen Menü drücken und die Datei anschließend speichern.
  - Die Datei durch Drücken auf „**Save Document**“ (Dokument speichern) in der Anwendungsleiste speichern. Es öffnet sich ein Fenster, das nach dem „Reason for change of entry“ (Grund für die Änderung des Eintrags) fragt.
  - „**Data analysis post run**“ (Datenanalyse nach dem Durchlauf) sowie andere für den Durchlauf wichtige Kommentare eingeben

## Anleitung zum Programmieren von Applied Biosystems 7500 Standard

Weitere Informationen finden sich im Benutzerhandbuch Artikelnummer 4387783 Rev. C.

- Das 7500 Softwarepaket starten.
- Die Schaltfläche „**Advanced Setup**“ (Erweitertes Setup) wählen, um Setup- und Experimenteigenschaften zu öffnen. Zur Aktivierung des Lyra SARS-CoV-2-Protokolls die einzelnen Schritte durchführen.
  - Experimentbezeichnung: „Experiment Name“ (Experimentkennung) als SARS-CoV-2 eingeben. Lassen Sie die Felder „Barcode“ (Strichcode), „User Name“ (Benutzername) und „Comments“ (Kommentare) leer
  - Setup des Experiments definieren: 7500 (96 Vertiefungen), Quantifizierungs-Standardkurve, TaqMan Reagenzien und Standard (ca. 2 Stunden für einen kompletten Lauf) auswählen
- Im Menü oben links „**Plate Setup**“ (Platten-Setup) wählen.
  - Ziele definieren: Neue Detektoren für SARS-CoV-2 und die Prozesskontrolle (PRC) müssen hinzugefügt werden.
    - Für jeden Detektor die folgenden Informationen eingeben.

Name	Reporterfarbstoff	Quencher-Farbstoff	Farbe
SARS-CoV-2	FAM	(keine)	(wählen)
PRC	Quasar 670	(keine)	(wählen)

- Für jedes Ziel die Schaltfläche „**Add New Target**“ (Neues Ziel hinzufügen) wählen.

- iii. Aus jedem Dropdown-Menü „Reporter“, „Quencher“ und „Color“ (Farbe) wählen
    - iv. Für jeden Detektor eine spezifische Farbe wählen
  - b. Ziele und Proben zuweisen: Unter dieser Registerkarte in der linken unteren Ecke „none“ (keine) als Passivreferenz auswählen.
- 4. „Run Method“ (Laufmethode) aus dem Menü oben links auswählen
  - a. Unter „Graphical“ (Grafische Darstellung) oder „Tabular View“ (Tabellarische Darstellung) das „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) je Vertiefung auf 20 µl setzen.
  - b. Thermocycler-Protokoll definieren: Unter „Graphical“ (Grafische Darstellung) oder „Tabular View“ (Tabellarische Darstellung) sollte das Standardprofil 2 Haltephasen und ein 2-stufiges Zyklusprotokoll sein. Jede Phase bietet dem Benutzer 3 editierbare Textfelder. Der erste Wert repräsentiert die Rate für die Temperaturänderung pro Sekunde (%) für diese Stufe, der zweite Wert die Temperatur (°C) und der dritte Wert die Zeit (Minuten: Sekunden).
    - i. Es sind die folgenden Änderungen am voreingestellten Thermalcycler-Protokoll vorzunehmen:
      1. Phase 1 Erste „Holding Stage“ (Haltephase)
        - a. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
        - b. Temp.: 55
        - c. Zeit: 5:00
      2. Schritt 1 Zweite „Holding Stage“ (Haltephase).
        - a. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
        - b. Temp.: 60
        - c. Zeit: 5:00
      3. Die zweite „Holding Stage“ (Haltephase) markieren und die Schaltfläche „Add Stage“ (Phase hinzufügen) wählen. Im Dropdown-Menü „Holding“ (Halten) wählen
      4. Schritt 1 „Third Holding Stage“ (Dritte Haltephase)
        - a. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
        - b. Temp.: 65
        - c. Zeit: 5:00
      5. Erste „2-Step Cycling Stage“ (2-stufige Zyklusphase)
        - a. Anzahl der Zyklen: 10
        - b. „Enable Auto Delta“ (Auto Delta aktivieren) NICHT auswählen
        - c. Schritt 1
          - i. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
          - ii. Temp.: 92
          - iii. Zeit: 0:05
        - d. Schritt 2
          - i. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
          - ii. Temp.: 57
          - iii. Zeit: 0:40
          - iv. Die Datenaufnahme auf „Off“ (Aus) stellen, indem die Schaltfläche „Data Selection“ (Datenauswahl) unter dem Temperaturschritt ausgewählt wird.
      6. Schritt 2 markieren und die Schaltfläche „Add Stage“ (Phase hinzufügen) wählen. Im Dropdown-Menü „Cycling“ (Zyklus) wählen
      7. Zweite „2-Step Cycling Stage“ (2-stufige Zyklusphase)
        - a. Anzahl der Zyklen: 30
        - b. „Enable Auto Delta“ (Auto Delta aktivieren) NICHT auswählen
        - c. Schritt 1
          - i. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
          - ii. Temp.: 92
          - iii. Zeit: 0:05
        - d. Schritt 2
          - i. Rate für Temperaturänderung pro Sek.: 100 %
          - ii. Temp.: 57
          - iii. Zeit: 0:40
          - iv. Sicherstellen, dass die Datenaufnahme für diesen Schritt auf „On“ (Ein) gestellt ist (Standardeinstellung)

8. Wenn eine falsche Phase hinzugefügt wurde, kann diese Phase durch Klicken auf die Schaltfläche „**Undo Add Stage**“ (Phase hinzufügen rückgängig machen) sofort nach dem Hinzufügen der Phase oder durch Markieren der Phase zwischen den vertikalen Linien und der Auswahl der Schaltfläche **Delete Selected** (Auswahl löschen) wieder entfernt werden.
5. Für jeden Analyt einen Schwellenwert festlegen.
  - a. Die Registerkarte „**Analysis**“ (Analyse) im Menü oben links wählen.
  - b. Die Schaltfläche „**Analysis Settings**“ (Analyseeinstellungen) in der oberen rechten Ecke wählen.
  - c. SARS-CoV-2 markieren und das Kästchen „**Use Default Settings**“ (Standardeinstellungen verwenden) deaktivieren. „**Automatic Threshold**“ (Automatischer Schwellenwert) deaktivieren und den Schwellenwert auf 75.000 stellen. „**Automatic Baseline**“ (Automatische Basislinie) aktiviert lassen.
  - d. PRC hervorheben und die Markierung des Felds **Use Default Settings** (Standardeinstellungen verwenden) aufheben. „**Automatic Threshold**“ (Automatischer Schwellenwert) deaktivieren und den Schwellenwert auf 10.000 einstellen. „**Automatic Baseline**“ (Automatische Basislinie) aktiviert lassen.
  - e. Unten im Feld die Schaltfläche „**Apply Analysis Settings**“ (Analyseeinstellungen anwenden) auswählen

Ziel	Schwellenwert	Anfang der Basislinie	Ende der Basislinie
SARS-CoV-2	75.000	Auto	Auto
PRC	10.000	Auto	Auto

- i. Das neue Protokoll für eine zukünftige Verwendung als Vorlage speichern.
  - i. Oben auf dem Bildschirm das Dropdown-Menü neben „**Save**“ (Speichern) wählen
  - ii. „**Save as Template**“ (Als Vorlage speichern) wählen
  - iii. In einem geeigneten Ordner speichern
  - iv. **Dateiname:** „Lyra SARS-CoV-2“
  - v. „**Save as type**“ (**Speichern als Dateityp**): „Experiment Document Template files (\*.edt)“ (**Experiment-Dokumentvorlagendateien**)
  - vi. Die Software beenden.

## Applied Biosystems 7500 Standard Thermocycler Testverfahren

1. Das 7500 Standard Softwarepaket v2.06 starten.
2. Das Dialogfeld „**Quick Startup document**“ (Dokument-Schnellstart) öffnet sich.
3. Auf „**Create a new document**“ (Neues Dokument erstellen) klicken.
4. Die meisten der folgenden Einstellungen sollten Standardeinstellungen sein. Bei Bedarf entsprechend anpassen.

<b>Assay:</b>	Standardkurve (Absolute Quantifikation)
<b>Gefäß:</b>	96-Vertiefungen durchsichtig
<b>Vorlage:</b>	Lyra SARS-CoV-2
<b>Durchlauf-Modus:</b>	Schnell 7500
<b>Bediener:</b>	<i>Ihr Bedienername</i>
<b>Kommentare:</b>	SDS v1.4
<b>Plattenname:</b>	<b>TTMMJJ-</b> Lyra SARS-CoV-2



5. Probenplatte einrichten
  - a. Unter den Registerkarten „**Setup**“ (**Setup**) und „**Plate**“ (Platte) erscheint das Platten-Setup.
  - b. Alle Vertiefungen auswählen, die eine Probe enthalten, rechtsklicken und aus dem Dropdown-Menü den „**Well Inspector**“ (Vertiefungsinspektor) wählen. Wenn sich das Dialogfenster „Well Inspector“ öffnet, die Detektoren für SARS-CoV-2 und PRC wählen.
  - c. Mithilfe des „**Well Inspectors**“ die Probenamen eingeben. Die Patienten-ID kann über das Well Inspector-Fenster eingegeben werden. Es wird jedoch empfohlen, dies vor dem Re-Suspendieren des lyophilisierten Mastermixes, nach dem Durchlauf oder unter Verwendung der Importierfunktion durchzuführen, um den Zeitraum zu minimieren, während dessen die PCR-Reaktionen vor dem Durchlaufstart der Raumtemperatur ausgesetzt sind.
  - d. Den Lauf als **TTMMJJ- Lyra SARS-CoV-2.sds** speichern.
  - e. Es öffnet sich ein Fenster, das nach dem „Reason for change of entry“ (Grund für die Änderung des Eintrags) fragt. „**Setup**“ (Setup) und andere für den Lauf wichtige Kommentare eingeben.
6. PCR starten
  - a. Die Registerkarte „**Instrument**“ (Gerät) wählen.
  - b. Die 96-Vertiefungen-PCR-Platte in das Gerät geben.
  - c. Unter „**Instrument Control**“ (**Gerätesteuerung**) die Schaltfläche „**Start**“ wählen, um den Lauf zu starten.
7. Nach der PCR
 

**WICHTIG:** Nach Abschluss des Laufs auf „OK“ drücken.

  - a. Zur Analyse der Daten auf die Schaltfläche „**Analyze**“ (Analysieren) im oberen Menü drücken und die Datei anschließend speichern.
  - b. Die Datei durch Drücken auf „**Save Document**“ (Dokument speichern) in der Anwendungsleiste speichern. Es öffnet sich ein Fenster, das nach dem „Reason for change of entry“ (Grund für die Änderung des Eintrags) fragt.
  - c. „**Data analysis post run**“ (Datenanalyse nach dem Durchlauf) sowie andere für den Durchlauf wichtige Kommentare eingeben.
8. Auswertung der Ergebnisse (siehe Tabelle 4)

## Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler Programmiervorgang

Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch Artikelnummer 10010424 Rev. D.

### Programmieranweisungen:

1. CFX96 Touch Softwarepaket starten
2. Im Dialogfenster des „**Startup Wizard**“ (Startup-Assistent) das **CFX96**-Gerät aus dem Dropdown-Menü wählen
3. Unter „**Select Run Type**“ (Lauftyp wählen) die Schaltfläche „**User-defined**“ (Benutzerdefiniert) drücken
4. Ein neues Thermocycler-Protokoll erstellen, indem „**Create New**“ (Neu erstellen) aus dem Fenster „**Run Setup**“ (Lauf-Setup) gewählt wird
5. Die folgenden Änderungen an den Zyklusbedingungen im „**Protocol Editor**“ (Protokoll-Editor) vornehmen:
  - a. Das „**Sample Volume**“ (Probenvolumen) auf **20 ul** ändern
  - b. Unter „**Tools**“ (Werkzeuge) in der Symbolleiste oben links „**Run Time Calculator**“ (Laufzeitkalkulator) wählen und „**96 Wells-All Channels**“ (96 Vertiefungen-Alle Kanäle) markieren
  - c. **Schritt 1 (Hold) (Halten)**
    - i. Wdh.: 1
    - ii. Temp.: 55 °C
    - iii. Zeit: 5:00
  - d. **Schritt 2 (Hold) (Halten)**
    - i. Wdh.: 1
    - ii. Temp.: 60 °C
    - iii. Zeit: 5:00
  - e. **Schritt 3 (Hold) (Halten)**
    - i. Wdh.: 1
    - ii. Temp.: 65 °C
    - iii. Zeit: 5:00
    - iv. Das Ablesen der Platte aus dieser Phase entfernen, indem unten links die Schaltfläche „**Remove Plate Read**“ (Plattenablesen entfernen) gewählt wird.
  - f. **Schritt 4**(2-stufige Amplifizierungsphase)

- i. „**Step 3**“ (Schritt 3) markieren und zur unteren linken Seite des Fensters gehen und insgesamt 2 Mal „**Insert Step**“ (Schritt einfügen) wählen, bis Schritt 5 erreicht ist (sicherstellen, dass oben links im Fenster im Dropdown-Menü für „**Insert Step**“ (Schritt einfügen) „**After**“ (Danach) ausgewählt ist).
    - ii. „**Step 4**“ (Schritt 4) markieren und Folgendes einstellen:
      - 1. Temp.: 92 °C
      - 2. Zeit: 0:05
    - iii. „**Step 5**“ (Schritt 5) markieren und Folgendes einstellen:
      - 1. Temp.: 57 °C
      - 2. Zeit: 0:40
      - 3. Im linken Teil des Bildschirms die Schaltfläche „**Remove Plate Read**“ (Plattenablesen entfernen) auswählen
    - iv. „**Step 6**“ (Schritt 6), den „**GOTO step**“ (GEH-ZU-Schritt) auswählen, den Status auf „**GOTO step 4**“ (GEH-ZU-Schritt 4) ändern und dann die Wiederholungen auf **9** einstellen.
  - g. **Schritt 7** „(2-Step Amplification Stage)“ (**2-stufige Amplifizierungsphase**)
    - i. Schritt 6 ist markiert; nun die Schaltfläche „**Insert Step**“ (Schritt einfügen) links unten im Fenster insgesamt zweimal auswählen (bis Schritt 8 erreicht ist)
    - ii. „**Step 7**“ (Schritt 7) markieren und Folgendes einstellen:
      - 1. Temp.: 92 °C
      - 2. Zeit: 0:05
    - iii. „**Step 8**“ (Schritt 8) markieren und Folgendes einstellen:
      - 1. Temp.: 57 °C
      - 2. Zeit: 0:40
      - 3. Im linken Teil des Bildschirms die Schaltfläche „**Add Plate Read to Step**“ (Plattenablesen dem Schritt hinzufügen) auswählen
      - 4. „**Step 8**“ (Schritt 8) markieren und links unten im Fenster die Schaltfläche „**Insert GOTO**“ (GEH ZU einfügen) auswählen
    - iv. „**Step 9**“ (Schritt 9), den „**GOTO step**“ (GEH-ZU-Schritt) auswählen und auf „**GOTO step 7**“ (GEH-ZU-Schritt 7) und dann die Wiederholungen auf **29** stellen.
  - h. Die neuen Zyklusbedingungen als Protokoll für die zukünftige Verwendung speichern
    - i. Oben links im Bildschirm die Schaltfläche „**Save**“ (Speichern) wählen
    - ii. Im „**ExpressLoad**“ (Schnell laden) Ordner speichern
    - iii. **Die Datei** „Lyra SARS-CoV-2“ **benennen**
    - iv. **Als Dateityp** „Protocol File (\*.prcl)“ (**Protokolldatei**) **speichern**
    - v. „**Save**“ (Speichern) auswählen
    - vi. Im Fenster Protokolleditor auf „**OK**“ klicken
6. Platten-Setup definieren
- a. Im Fenster „**Run Setup**“ (Lauf-Setup) die Registerkarte „**Plate**“ (Platte) wählen
  - b. Unter „**Express Load**“ im Dropdown-Menü „**Quick Plate 96 wells All Channels.pltd**“ (Schnell-Platte 96 Vertiefungen Alle Kanäle) wählen
  - c. Die Schaltfläche „**Edit Selected**“ (Auswahl bearbeiten) auswählen, um das Platten-Setup individuell anzupassen
  - d. In der oberen Symbolleiste „**Settings**“ (Einstellungen) auswählen. Es müssen die Standardeinstellungen eingestellt werden.
    - i. **Unter „Plate Size“ (Plattengröße) „96 Wells“ (96 Vertiefungen) auswählen**
    - ii. **Unter „Plate Type“ (Plattentyp) „BR Clear“ (BR durchsichtig) auswählen**
    - iii. **Unter „Number Convention“ (Zahlenkonvention) „Scientific Notation“ (Wissenschaftliche Notation) auswählen**
    - iv. **Unter „Units“ (Einheiten) „Copy Number“ (Kopienzahl) auswählen**
  - e. Den „**Scan Mode**“ (Scanmodus) oben im Fenster auf „**All Channels**“ (Alle Kanäle) gestellt lassen
  - f. Die Schaltfläche „**Select Fluorophores**“ (Fluorophore auswählen) oben rechts im Platteneditor-Fenster auswählen
    - i. Alle Standard-Fluorophore deaktivieren
    - ii. „**FAM**“ und „**Cy5**“ auswählen und auf „**OK**“ klicken
  - g. Im Fenster „**Plate Editor**“ (Platteneditor) die ganze Platte markieren und das Kästchen vor allen Fluorophoren anklicken: „**FAM**“ und „**Cy5**“
  - h. Die Schaltfläche „**Experiment Settings**“ (Experimenteinstellungen) wählen, um die Ziele zu definieren

- i. Unten links im Fenster „**Experiment Settings**“ (Experimenteinstellungen) in das „**New**“ (Neu) Feld **SARS-CoV-2** eingeben und „**Add**“ (Hinzufügen) auswählen
  - ii. Dasselbe für die **PRC** wiederholen
  - iii. **Ok** wählen
- i. Im Fenster „**Plate Editor**“ (Platteneditor) neben **FAM** im Dropdown-Menü unter „**Target Name**“ (Zielname) **SARS-CoV-2** auswählen und für Cy5 **PRC** auswählen
- j. Das neue Platten-Setup für die zukünftige Verwendung speichern
  - i. Oben links im Bildschirm die Schaltfläche „**Save**“ (Speichern) wählen
  - ii. Im „**ExpressLoad**“ (Schnell laden) Ordner speichern
  - iii. **Die Datei** „Lyra SARS-CoV-2 plate“ (**Lyra SARS-CoV-2-Platte**) benennen
  - iv. **Als Dateityp** „Plate File (\*.pltd)“ (**Plattendatei**) speichern
  - v. „**Save**“ (Speichern) auswählen
  - vi. Im Fenster „**Plate Editor**“ (Platteneditor) auf **Ok** klicken
- k. Die Software beenden

## Bio-Rad CFX96 Touch Thermocycler Testverfahren

### Anweisungen für die Analyse:

1. Die zu analysierende Lauf-Datei öffnen
2. Oben links „**Quantification Tab**“ (Registerkarte Quantifizierung) auswählen
3. In der Ansicht Amplifizierungskurve „**Log Scale**“ (Log-Skala) aktivieren
4. „**Settings**“ (Einstellungen) in der Symbolleiste oben links am Bildschirm auswählen
  - a. Unter „**Cq Determination Mode**“ (Cq Bestimmungsmodus) „**Single Threshold**“ (Einzel-Schwellenwert) auswählen
  - b. Unter „**Baseline Setting**“ (Einstellung Basislinie) „**Baseline Subtracted Curve Fit**“ (Abzug Basislinie mit Kurvenanpassung) auswählen
  - c. Unter „**Analysis Mode**“ (Analysemodus) „**Target**“ (Ziel) auswählen
  - d. Unter „**Cycles to Analyze**“ (Zu analysierende Zyklen) 1-30 auswählen und dann auf **Ok** klicken
  - e. Es müssen die Basislinienzyklen und der Schwellenwert für jedes Ziel eingestellt werden
    - i. Sicherstellen, dass nur das Kästchen **SARS-CoV-2** in der Amplifizierungsdarstellung markiert ist
    - ii. In „**Settings**“ (Einstellungen) in der Symbolleiste „**Baseline Threshold**“ (Basislinien-Schwellenwert) auswählen
      1. Oben im Kästchen „**Auto Calculated**“ (Autom. Berechnung) für die „**Baseline Cycles**“ (Basislinienzyklen) auswählen
      2. Unten im Kästchen „**Single Threshold**“ (Einzel-Schwellenwert) „**User Defined**“ (Benutzerdefiniert) auswählen
        - a. Auf **164** stellen
        - b. **OK** wählen
    - iii. **Das Kästchen SARS-CoV-2** deaktivieren und das Kästchen **PRC** in der Amplifizierungsdarstellung markieren
    - iv. In „**Settings**“ (Einstellungen) in der Symbolleiste „**Baseline Threshold**“ (Basislinien-Schwellenwert) auswählen
      1. Oben im Kästchen „**Auto Calculated**“ (Autom. Berechnung) für die „**Baseline Cycles**“ (Basislinienzyklen) auswählen
      2. Unten im Kästchen „**Single Threshold**“ (Einzel-Schwellenwert) „**User Defined**“ (Benutzerdefiniert) auswählen
        - a. Auf **100** stellen
        - b. **OK** wählen
5. Die Software beenden
6. Auswertung der Ergebnisse (siehe Tabelle 4)

## Qiagen Rotor-Gene Q Programmieranweisungen

Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch Artikelnummer 1065453EN.

### Programmieranweisungen:

1. Rotor-Gene Q Softwarepaket starten
2. Im Dialogfenster „**New Run**“ (Neuer Lauf) die Registerkarte „**Advanced**“ (Erweiterte Einstellungen) oben im Bildschirm auswählen
3. „**Empty Run**“ (Leerer Lauf) und dann „**New**“ (Neu) unten rechts im Dialogfenster auswählen, um den „**Advanced Run Wizard**“ (Assistent für erweiterte Laufeinstellungen) zu starten
  - a. Im „**Advanced Run Wizard**“ (Assistent für erweiterte Laufeinstellungen) oben links im Bildschirm die entsprechende Rotorgröße auswählen
  - b. Das Feld markieren, das anzeigt, dass der „**Locking Ring**“ (Sicherungsring) „**Attached**“ (Befestigt) ist und „**Next**“ (Weiter) auswählen
  - c. Die Abschnitte „**Operator**“ (Bediener) und „**Notes**“ (Anmerkungen) leer lassen
  - d. Unten links im Bildschirm **20 ul** als „**Reaction Volume**“ (Reaktionsvolumen) eingeben
  - e. Für das „**Sample Layout**“ (Proben-Layout) **1, 2, 3...** wählen und dann „**Next**“ (Weiter) wählen
  - f. Unter „**Channel Setup**“ (Kanal-Setup) „**Create New**“ (Neu erstellen) auswählen, um Informationen für jeden Detektor einzugeben
    - i. Unter „**Name**“ **SARS-CoV-2** eingeben
    - ii. **Unter Quelle 470 nm auswählen**
    - iii. **Unter Detektor 510 nm auswählen**
    - iv. Die standardmäßige „**Gain**“ (Verstärkung)-Einstellung von 7 nicht anpassen, da diese in einem späteren Schritt eingestellt wird
    - v. **OK** wählen
  - g. Den Schritt oben wiederholen, indem „**Create New**“ (Neu erstellen) gewählt wird
    - i. Unter **Name PRC** eingeben
    - ii. **Unter Quelle 625 nm auswählen**
    - iii. **Unter Detektor 660 nm auswählen**
    - iv. Die standardmäßige „**Gain**“ (Verstärkung)-Einstellung von 7 nicht anpassen, da diese in einem späteren Schritt eingestellt wird
    - v. **OK** wählen
  - h. Die Schaltfläche „**Edit Profile**“ (Profil bearbeiten) in der Mitte des Fensters auswählen, um ein Zyklusprofil einzurichten
    - i. Im Fenster „**Edit Profile**“ (Profil bearbeiten) oben links im Bildschirm auf „**New**“ (Neu) gehen und im Dropdown-Menü **Cycling** (Zyklus) auswählen. Es sollte eine Halte- und Drei-Stufen-Zyklusphase aufscheinen.
    - ii. Die Haltephase auf eine Temperatur von **55 °C** und eine Zeit von **5:00 Minuten** anpassen
    - iii. Die Schaltfläche „**Insert After**“ (Einfügen nach) in der Mitte des Dialogfensters auswählen und dann „**New Hold at Temperature**“ (Neuen Halteschritt bei Temperatur) auswählen
    - iv. Die zweite Haltephase auf eine Temperatur von **60 °C** und eine Zeit von **5:00 Minuten** anpassen
    - v. Die Schaltfläche „**Insert After**“ (Einfügen nach) in der Mitte des Dialogfensters auswählen und dann „**New Hold at Temperature**“ (Neuen Halteschritt bei Temperatur) auswählen, um eine dritte Haltephase einzufügen
    - vi. Die dritte Haltephase auf eine Temperatur von **65 °C** und eine Zeit von **5:00 Minuten** anpassen
    - vii. Die erste „**Cycling Stage**“ (Zyklusphase) markieren und wie folgt modifizieren:
      1. Dieser Zyklus wiederholt sich **10** mal
      2. „**Timed Step**“ (Zeitlich festgelegter Schritt) aus dem Dropdown-Menü in der Mitte links im Bildschirm auswählen
      3. Nicht „**Long Range**“ (Langer Bereich) oder „**Touchdown**“ (Schrittweise Absenkung) links im Bildschirm auswählen
      4. Der erste Schritt:
        - a. **92 °C**
        - b. **5 Sekunden**
        - c. **„Not Acquiring“ (Keine Aufnahme)**
      5. Schritt zwei auswählen und wie folgt einstellen:
        - a. **57 °C**
        - b. **40 Sekunden**
        - c. **„Not Acquiring“ (Keine Aufnahme)**

6. Schritt drei markieren und löschen, indem die Schaltfläche “-“ in der Mitte des Fensters ausgewählt wird
7. Die Schaltfläche „**Insert After**“ (Einfügen nach) in der Mitte des Dialogfensters auswählen und dann „**New Cycling**“ (Neuer Zyklus) auswählen
- viii. Die zweite „**Cycling Stage**“ (Zyklusphase) markieren und wie folgt modifizieren:
  1. Dieser Zyklus wiederholt sich **30** mal
  2. „**Timed Step**“ (Zeitlich festgelegter Schritt) aus dem Dropdown-Menü in der Mitte links im Bildschirm auswählen
  3. Nicht „**Long Range**“ (Langer Bereich) oder „**Touchdown**“ (Schrittweise Absenkung) links im Bildschirm auswählen
  4. Der erste Schritt:
    - a. **92 °C**
    - b. **5 Sekunden**
    - c. „**Not Acquiring**“ (**Keine Aufnahme**)
  5. Schritt zwei auswählen und wie folgt einstellen:
    - a. **57 °C**
    - b. **40 Sekunden**
    - c. „**Acquiring to Cycling A**“ (Aufnahme an Cycling A) auswählen
      - i. **Unter „Acquiring Channels“ (Kanäle aufnehmen)** den standardmäßigen Kanalnamen (Grün) markieren und die Schaltfläche < auswählen, um ihn in die Liste „**Available Channels**“ (Verfügbare Kanäle) zu verschieben
      - ii. In der Liste „**Available Channels**“ (Verfügbare Kanäle) **SARS-CoV-2** auswählen und die Schaltfläche > auswählen, um ihn in die Liste „**Acquiring Channels**“ (Kanäle aufnehmen) zu verschieben
      - iii. Den Schritt oben für **PRC** wiederholen und dann **OK** auswählen
  6. Schritt drei markieren und löschen, indem die Schaltfläche “-“ in der Mitte des Fensters ausgewählt wird
- ix. Im Fenster „**Edit Profile**“ (Profil bearbeiten) **OK** auswählen
- i. Im Fenster „**New Run Wizard**“ (Assistent für neuen Lauf) „**Gain Optimisation**“ (Optimierung der Verstärkung) auswählen
  - i. In der Mitte des Fensters „**Auto-Gain Optimisation Setup**“ (Setup Autom. Optimierung der Verstärkung) das Dropdown-Menü unter „**Channel Settings**“ (Kanaleinstellungen) auswählen und **SARS-CoV-2** auswählen.
  - ii. Die Schaltfläche „**Add**“ (Hinzufügen) auf der rechten Seite auswählen
    1. Sicherstellen, dass im Fenster „**Auto-Gain Optimisation Channel Settings**“ (Einstellung des Kanals für die autom. Optimierung der Verstärkung) die SARS-CoV-2 „**Tube Position**“ (Röhrchenposition) auf **1** eingestellt ist. Dafür ist es erforderlich, dass eine Positivkontrolle, die SARS-CoV-2 und PRC enthält, mit jedem PCR-Lauf getestet und in das erste Röhrchen gegeben wird. Wird dies nicht beachtet, kann die Verstärkung falsch eingestellt werden.
    2. Die Standardeinstellungen 5-10 FI und -10 bis 10 für „**Target Sample Range**“ (Zielprobenbereich) und „**Acceptable Gain Range**“ (Akzeptabler Verstärkungsbereich) eingestellt lassen.
    3. **OK** wählen
    4. Die Schritte 3. j. ii. 1-3 für die **PRC** wiederholen
  - iii. Im Fenster „**Auto-Gain Optimisation Setup**“ (Setup Autom. Optimierung der Verstärkung) das Kästchen neben „**Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition**“ (**Optimierung vor der ersten Aufnahme durchführen**) markieren
  - iv. „**Close**“ (Schließen) auswählen
- j. Im Fenster „**New Run Wizard**“ (Assistent für neuen Lauf) die Schaltfläche „**Next**“ (Weiter) auswählen
- k. Das neue Protokoll für eine zukünftige Verwendung als Vorlage speichern
  - i. Unten rechts im Fenster die Schaltfläche „**Save Template**“ (Vorlage speichern) auswählen
  - ii. **Speichern unter:** C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates
  - iii. **Dateiname:** „Lyra SARS-CoV-2“
  - iv. **Als Dateityp:** „Template (\*.ret)“ **speichern**
- l. Die Software beenden

## Qiagen Rotor-Gene Q Testlauf

### Anweisungen für die Analyse:

1. Im „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf) die Vorlage für SARS-CoV-2 laden.
2. Start drücken.
3. Die zu analysierende Lauf-Datei öffnen
4. In der oberen Menü-Symbolleiste die Schaltfläche **„Analysis“** (Analyse) auswählen
  - a. **„Quantitation“** (Quantifizierung), dann **„Cycling A. SARS-CoV-2“** und **„Show“** (Zeigen) auswählen
  - b. Der Schwellenwert muss für SARS-CoV-2 eingestellt sein
    - i. Ganz rechts unten im Bildschirm unter **„CT Calculation“** (CT-Berechnung) **0.03** für den **„SARS-CoV-2 Threshold“** (SARS-CoV-2 Schwellenwert) eingeben.
    - ii. Sicherstellen, dass in dem Kästchen **„Eliminate Cycles before“** (Ausschluss der Zyklen vor) der Standardwert **1** eingegeben ist
    - iii. Sicherstellen, dass die Amplifizierungskurve auf **„Log Scale“** (Log-Skala) eingestellt ist [Umschaltknopf unten links in der Darstellung zeigt **„Linear Scale“** (Lineare Skala) oder **„Log Scale“** (Log-Skala) an]
  - c. **„Quantitation“** (Quantifizierung), dann **„Cycling A. PRC“** und **„Show“** (Zeigen) auswählen
  - d. Der Schwellenwert muss für PRC eingestellt sein
    - i. Ganz rechts unten im Bildschirm unter **„CT Calculation“** (CT-Berechnung) **0.05** für den **„PRC Threshold“** (PRC-Schwellenwert) eingeben
    - ii. Sicherstellen, dass in dem Kästchen **„Eliminate Cycles before“** (Ausschluss der Zyklen vor) der Standardwert **1** eingegeben ist
    - iii. Sicherstellen, dass die Amplifizierungskurve auf **„Log Scale“** (Log-Skala) eingestellt ist [Umschaltknopf unten links in der Darstellung zeigt **„Linear Scale“** (Lineare Skala) oder **„Log Scale“** (Log-Skala) an]
5. Auswertung der Ergebnisse (siehe Tabelle 4)

## Roche LightCycler 480 Instrument II Programmieranweisungen

Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch Artikelnummer 05152062001 0208.

### Erstellung einer Vorlage für den LightCycler 480 II Assay-Lauf

1. LightCycler 480 Softwarepaket starten
2. Das **„Detection Format“** (Detektionsformat) muss festgelegt sein, damit die Kanäle definiert werden können, in denen die Fluoreszenz gelesen wird
  - a. Im Startup-Bildschirm rechts unten im Bildschirm **„Tools“** (Werkzeuge) auswählen
  - b. **„Detection Formats“** (Detektionsformate) und dann **„New“** (Neu) auswählen
  - c. Das Format **„Lyra SARS-CoV-2“** benennen
  - d. Im Fenster **„Filter Combination Selection“** (Auswahl Filterkombination) 465-510 und 618-660 auswählen
  - e. Im Fenster **„Selected Filter Combination List“** (Ausgewählte Filterkombinationsliste) unter dem Namen SARS-CoV-2 für 465-510 und PRC für 618-660 eingeben
  - f. Unter Melt Factor, Quant Factor und Max Integration Time alle Standardeinstellungen auf 1 belassen
  - g. **„Close“** (Schließen) auswählen, um das neue Detektionsformat zu speichern und zum Startup-Bildschirm zurückzukehren
  - h. Um auf dieses neu erstellte **„Detection Format“** (Detektionsformat) zuzugreifen, muss die LightCycler 480 Software geschlossen und neu geladen werden
3. Nach dem Schließen und erneutem Laden der Software **„White Plates“** (Weiße Platten) und **„New Experiment“** (Neues Experiment) unter dem Fenster **„Experiment creation“** (Experimenterstellung) auswählen
4. Auf dem nächsten Bildschirm **„Lyra SARS-CoV-2“** vom Pulldown-Menü unter **„Detection Formats“** (Detektionsformate) auswählen
5. Oben rechts im Bildschirm **20 ul** als **„Reaction Volume“** (Reaktionsvolumen) eingeben
6. Die Namen für jedes RT-PCR-Programm eingeben
  - a. Unter **„Program Name“** (Programmname) **„Stage 1“** (Phase 1) eingeben, unter **„Cycles“** (Zyklen) **1** eingeben und in **„Analysis Mode“** (Analysemodus) **„none“** (Keine) auswählen
  - b. Das Symbol **„+“** auswählen, um ein Programm hinzuzufügen
  - c. Das nächste Programm **„Stage 2“** (Phase 2) benennen, unter **„Cycles“** (Zyklen) **1** eingeben und in **„Analysis Mode“** (Analysemodus) **„none“** (Keine) auswählen
  - d. Das Symbol **„+“** auswählen, um ein Programm hinzuzufügen

- e. Das nächste Programm „**Stage 3**“ (Phase 3) benennen, unter „**Cycles**“ (Zyklen) **1** eingeben und in „**Analysis Mode**“ (Analysemodus) „**none**“ (Keine) auswählen
  - f. Das Symbol „+“ auswählen, um ein Programm hinzuzufügen
  - g. Das nächste Programm „**Stage 4**“ (Phase 4) benennen, unter „**Cycles**“ (Zyklen) **40** eingeben und in „**Analysis Mode**“ (Analysemodus) „**Quantification**“ (Quantifizierung) auswählen
7. Die RT-PCR-Zykluszeiten und die Temperaturen einstellen
- a. „**Stage 1**“ (Phase 1) unter „**Program Name**“ (Programmname) markieren und „**Stage 1 Temperature Targets**“ (Temperaturziele Phase 1) wie folgt ändern:
    - i. „**Target**“ (Ziel) (°C) auf **55** einstellen
    - ii. „**Acquisition Mode**“ (Akquisitionsmodus) „**none**“ (Keine) auswählen
    - iii. „**Hold**“ (Halten) (hh:mm:ss) auf **5:00** einstellen
    - iv. **Rate für Temperaturänderung pro Sek. (°C/s)** auf 4,4
    - v. „**Sec Target**“ (Zweite Zieltemperatur) (°C), „**Step Size**“ (Schrittgröße) (°C) und „**Step Delay**“ (Schrittverzögerung) (Zyklen) für die Phasen 1-4 auf 0 belassen.
  - b. „**Stage 2**“ (Phase 2) unter „**Program Name**“ (Programmname) markieren und „**Stage 2 Temperature Targets**“ (Temperaturziele Phase 2) wie folgt ändern:
    - i. „**Target**“ (Ziel) (°C) auf **60** einstellen
    - ii. „**Acquisition Mode**“ (Akquisitionsmodus) „**none**“ (Keine) auswählen
    - iii. „**Hold**“ (Halten) (hh:mm:ss) auf **5:00** einstellen
    - iv. **Rate für Temperaturänderung pro Sek. (°C/s)** auf 4,4
  - c. „**Stage 3**“ (Phase 3) unter „**Program Name**“ (Programmname) markieren und „**Stage 3 Temperature Targets**“ (Temperaturziele Phase 3) wie folgt ändern:
    - i. „**Target**“ (Ziel) (°C) auf **65** einstellen
    - ii. „**Acquisition Mode**“ (Akquisitionsmodus) „**none**“ (Keine) auswählen
    - iii. „**Hold**“ (Halten) (hh:mm:ss) auf **5:00** einstellen
    - iv. **Rate für Temperaturänderung pro Sek. (°C/s)** auf 4,4
  - d. „**Stage 4**“ (Phase 4) unter „**Program Name**“ (Programmname) markieren und „**Stage 4 Temperature Targets**“ (Temperaturziele Phase 4) wie folgt ändern:
    - i. Der erste Schritt:
      1. „**Target**“ (Ziel) (°C) auf **92** einstellen
      2. „**Acquisition Mode**“ (Akquisitionsmodus) „**none**“ (Keine) auswählen
      3. „**Hold**“ (Halten) (hh:mm:ss) auf **0:05** einstellen
      4. **Rate für Temperaturänderung pro Sek. (°C/s)** auf 4,4
    - ii. Das Symbol „+“ auswählen, um einen Schritt hinzuzufügen und den zweiten Schritt einzustellen:
      1. „**Target**“ (Ziel) (°C) auf **57** einstellen
      2. „**Acquisition Mode**“ (Akquisitionsmodus) „**single**“ (Einzel) auswählen
      3. „**Hold**“ (Halten) (hh:mm:ss) auf **0:40** einstellen
      4. **Rate für Temperaturänderung pro Sek. (°C/s)** auf 2,2
8. Das neue Protokoll für eine zukünftige Verwendung als Lauf-Vorlage speichern.
- a. In der linken unteren Ecke des Bildschirms das Pulldown-Menü neben der Schaltfläche „**Apply Template**“ (Vorlage verwenden) auswählen
  - b. „**Save as Template**“ (Als Vorlage speichern) wählen
  - c. Den „**Templates Folder**“ (Vorlagen-Ordner) auswählen
  - d. Den „**Run Templates Folder**“ (Ordner Lauf-Vorlagen) markieren
  - e. Die Vorlage Lyra SARS-CoV-2 Lauf-Vorlage nennen und auf die Schaltfläche zum Bestätigen klicken
9. Die Software beenden.

### Erstellung eines LightCycler 480 II Assay-Testverfahrens

1. Die Lauf-Vorlage Lyra SARS-CoV-2 laden.
2. Start drücken.
3. Die Analysevorlage kann erst nach Abschluss des ersten Experiments erstellt werden
4. In dem Lyra SARS-CoV-2 Lauf die Schaltfläche „**Analysis**“ (Analyse) in der Modulleiste auswählen
  - a. „**Abs Quant/Fit Points**“ wählen
  - b. In dem Dialogfenster „**Create New Analysis**“ (Neue Analyse erstellen) Ihre vordefinierte Untergruppe aus dem Dropdown-Menü „**Subset**“ (Untergruppe) auswählen und dann die Schaltfläche zum Bestätigen klicken
  - c. Den „**Background**“ (Hintergrund) für alle Analyten auf 2-10 stellen

- i. „**Min Offset**“ auf 1 stellen
    - ii. „**Max Offset**“ auf 9 stellen
  - d. In der Mitte unten auf dem Bildschirm sicherstellen, dass „**Color Compensation**“ (Farbkompensation) für alle Analyten ausgeschaltet ist
  - e. Die Standardeinstellungen „**First Cycle**“ (Erster Zyklus) auf 1 und „**Last Cycle**“ (Letzter Zyklus) auf 40 belassen
5. Oben in der Mitte auf dem Bildschirm „**Noise Band**“ (Rauschband) auswählen
  6. Das Pulldown-Menü neben der Schaltfläche „**Noise Band**“ (Rauschband) auswählen und „**Noise Band Fluorescence**“ (Rauschband-Fluoreszenz) auswählen
  7. Das Rauschband für jeden Analyten unter der Schaltfläche „**Filter Comb**“ (Filterkombination) wie folgt einstellen:
    - a. SARS-CoV-2 auf 1,95 stellen
    - b. PRC auf 1,4619 stellen
  8. „**Calculate**“ (Berechnen) unten links im Bildschirm auswählen
  9. Das neue Analyseprotokoll für eine zukünftige Verwendung als Vorlage speichern
    - a. In der linken unteren Ecke des Bildschirms das Pulldown-Menü neben der Schaltfläche „**Apply Template**“ (Vorlage verwenden) auswählen
    - b. „**Save as Template**“ (Als Vorlage speichern) wählen
    - c. Den „**Templates Folder**“ (Vorlagen-Ordner) auswählen
    - d. Den „**Analysis Templates Folder**“ (Ordner Analyse-Vorlagen) markieren
    - e. Die Vorlage Lyra SARS-CoV-2 Analyse-Vorlage nennen und auf die Schaltfläche zum Bestätigen klicken.
  10. Einen Bericht erstellen
    - a. Das Symbol „**Save**“ (Speichern) in der globalen Aktionsleiste auf der rechten Seite des Bildschirms auswählen
    - b. Die Schaltfläche „**Report**“ (Bericht) in der Modulleiste auf der linken Seite des Bildschirms auswählen
    - c. Die entsprechenden Einstellungen auswählen und die Schaltfläche „**Generate**“ (Generieren) drücken
  11. Anwendung einer Analyse-Vorlage für spätere Läufe
    - a. Sobald der Lauf abgeschlossen ist, die Schaltfläche „**Analysis**“ (Analyse) in der Modulleiste auswählen
    - b. „**Abs Quant/Fit Points**“ wählen
    - c. In dem Dialogfenster „**Create New Analysis**“ (Neue Analyse erstellen) Ihre vordefinierte Untergruppe aus dem Dropdown-Menü „**Subset**“ (Untergruppe) auswählen und dann die Schaltfläche zum Bestätigen klicken
    - d. Die Schaltfläche „**Apply Template**“ (Vorlage verwenden) ganz links am Bildschirm auswählen und die Lyra SARS-CoV-2 Analysevorlage aus dem „**Analysis Templates Folder**“ (Ordner Analysevorlagen) auswählen
    - e. Im Dialogfenster „**Yes**“ (Ja) auswählen
  12. Auswertung der Ergebnisse (siehe Tabelle 4)

## Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro Programmieranweisungen

Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch Artikelnummer 4489822 Revision A.

### Programmieranweisungen:

1. Die Design- und Analysesoftware öffnen
2. Die Option „**SET UP PLATE**“ (Platte einrichten) auswählen
3. In der Seitenleiste auf dem Bildschirm die folgenden Eigenschaften zum Filtern auswählen:
  - a. Instrument – QuantStudio 7 Pro
  - b. Block – 96-Well 0.2 mL (96 Vertiefungen)
  - c. Run Mode – Fast (Laufmodus - Schnell)
  - d. Die Analyseoptionen leer belassen
4. Aus den auf dem Bildschirm angezeigten Plattenauswahlmöglichkeiten die Systemvorlage „**PCR Only**“ (Nur PCR) auswählen und das System wird automatisch zur Registerkarte „**Run Method**“ (Lauf-Methode) navigieren
5. Run Method (Lauf-Methode)
  - a. Das „**Reaction Volume**“ (Reaktionsvolumen) auf 20.0 uL stellen
  - b. Die Temperatur der aktivierten beheizten Abdeckung bleibt bei 105,0 Grad C
  - c. Über die „**Hold stage**“ (Haltephase) scrollen, die in den Zyklusparametern vorhanden ist, und die Schaltflächen Hinzufügen und Entfernen werden sowohl oben als auch unten in der ersten Phase sichtbar.
  - d. Mit der linken Maustaste auf die rechte Schaltfläche Hinzufügen oben klicken, und eine Liste der Auswahlmöglichkeiten für die Phasen wird sichtbar. Hinunterscrollen und „**Hold**“ (Halten) auswählen.



- e. Die vorherigen Schritte wiederholen, sodass drei Haltephasen in den Zyklusparametern vorhanden sind.
  - f. Zur PCR-Phase scrollen und die Schaltflächen Hinzufügen und Entfernen werden sowohl oben als auch unten sichtbar. Mit der linken Maustaste auf die rechte Schaltfläche Hinzufügen oben klicken, und eine Liste der Auswahlmöglichkeiten für die Phasen wird sichtbar. Hinunterscrollen und „PCR“ auswählen.
  - g. Zur ersten Stufe zurückkehren, und die folgenden Parameter eingeben:
    - i. Phase 1 Hold (Halten)
      - 1. 2,63 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
      - 2. 55 °C
      - 3. 5 Minuten
    - ii. Phase 2 Hold (Halten)
      - 1. 2,63 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
      - 2. 60 °C
      - 3. 5 Minuten
    - iii. Phase 3 Hold (Halten)
      - 1. 2,63 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
      - 2. 65 °C
      - 3. 5 Minuten
    - iv. Phase 4 PCR
      - 1. Schritt 1:
        - a. 2,63 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
        - b. 92 °C
        - c. 5 Sekunden
      - 2. Schritt 2:
        - a. 2,32 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
        - b. 57 °C
        - c. 40 Sekunden
        - d. Unter Schritt 2 auf das Kamerasymbol klicken. Es öffnet sich ein Fenster mit der Bitte um Bestätigung, die Datenaufnahme während dieses Schrittes abzuschalten. „OK“ klicken
    - v. Die Anzahl der Zyklen am unteren Ende der PCR-Stufe 4 auf 10 ändern
    - vi. Phase 5 PCR
      - 1. Schritt 1:
        - a. 2,63 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
        - b. 92 °C
        - c. 5 Sekunden
      - 2. Schritt 2:
        - a. 2,32 Rate für Temperaturänderung pro Sek.
        - b. 57 °C
        - c. 40 Sekunden
        - d. Sicherstellen, dass das Bild des Kamerasymbols für die Datenaufnahme während der 30 Zyklen von Phase 5, Schritt 2 fett/an ist.
    - vii. Die Anzahl der Zyklen am unteren Ende der PCR-Stufe 5 auf 30 ändern.
  - h. Nach oben blättern und die Registerkarte „Plate Setup“ (Platteneinrichtung) im oberen Bildschirmbereich auswählen.
6. Platten-Setup (Platteneinrichtung)
- a. Die Passivreferenz auf „NONE“ (KEINE) stellen
  - b. Sicherstellen, dass auf der unteren rechten Seite des Bildschirms die Registerkarte „Targets“ (Ziele) ausgewählt ist, dann markieren und die Schaltfläche Hinzufügen drücken, um „Target 1“ (Ziel 1) hinzuzufügen. Noch einmal drücken, um „Target 2“ (Ziel 2) hinzuzufügen
  - c. Auf das Feld „Target 1“ (Ziel 1) klicken und den Namen zu CoV-2 ändern.
  - d. Auf das zugehörige Reporter-Feld unter der Reporter-Registerkarte klicken und aus dem Dropdown-Menü FAM auswählen.
  - e. Auf das Feld „Target 2“ (Ziel 2) klicken und den Namen zu PRC ändern.
  - f. Auf das zugehörige Reporter-Feld unter der Reporter-Registerkarte klicken und aus dem Dropdown-Menü CY5 auswählen.
  - g. Die Schaltfläche „Actions“ (Aktionen) auf der oberen rechten Seite des Bildschirms markieren und die Dropdown-Schaltfläche drücken. Im Dropdown-Menü „Analysis Setting“ (Analyseeinstellung) wählen

- h. Unter Analyseeinstellung Folgendes für alle Ziele deaktivieren:
  - i. Use Default Column (Standardspalte verwenden)
  - ii. Auto Threshold Column (Autom. Schwellenwertspalte)
  - iii. Auto Baseline Column (Autom. Basislinienspalte)
  - iv. Der Anfang der Basislinie und das Ende der Basislinie sollten standardmäßig 3 und 15 sein
- i. Unter „Threshold“ (Schwelle) auf das Kästchen, das mit dem CoV-Ziel verbunden ist, klicken und 70.000 eingeben.
- j. Unter „Threshold“ (Schwelle) auf das Kästchen, das mit dem PRC-Ziel verbunden ist, klicken und 20.000 eingeben
- k. Auf „Save“ (Speichern) klicken
- l. Zurück zur Schaltfläche „Actions“ (Aktionen) navigieren, die Dropdown-Schaltfläche drücken und „Save as“ (Speichern unter) wählen. Dadurch wird Ihre Vorlage an einem Ort Ihrer Wahl gespeichert. Die Vorlage als „Lyra SARS Cov-2 Assay“ speichern.

## Erstellung eines Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro Testverfahrens

**Hinweis:** Diese Anweisungen basieren darauf, dass der Benutzer das QuantStudio 7 Pro Real-Time-PCR-Gerät und die Applied Biosystems Design und Analyse 2.2-Software nicht verknüpft hat. Der Benutzer muss die zuvor mit der Software erstellte Lyra SARS CoV-2-Vorlage öffnen und jede neu erstellte Probenlaufvorlage auf einen USB-Stick speichern und die Vorlage auf das Gerät übertragen.

Für Fragen bei Verbindungsproblemen im Zusammenhang mit der Software und dem Gerät wenden Sie sich bitte an Ihren Thermo Fisher/Applied Biosystems QuantStudio-Vertreter.

1. Die zuvor erstellte Lyra SARS CoV-2 Assay-Vorlage öffnen.
2. Auf die Registerkarte „Plate Setup“ (Platten-Setup) im oberen Bildschirmbereich klicken.
3. Sicherstellen, dass auf der rechten Seite des Bildschirms die Registerkarte „Samples“ (Proben) markiert ist, und auf die Schaltfläche Hinzufügen drücken, um die Anzahl der zu testenden Proben hinzuzufügen.
4. Auf das Feld „Sample 1“ (Probe 1) klicken, um die Probe neu zu benennen. Diesen Schritt für alle danach eingegebenen Proben wiederholen.
5. Auf die Vertiefung klicken, die sich in der Plattenkarte befindet, und dann das Kästchen neben dem Namen der Probe in der rechten Seitenleiste markieren, um den Namen der Vertiefung zuzuordnen.
  - a. Der Benutzer hat auch die Möglichkeit, die Position der Vertiefung in der Plattenkarte zu markieren und auf das Feld „Enter Sample“ (Probe eingeben) zu klicken. Die Probenkennung eingeben und auf die Registerkarte drücken, um zur nächsten Vertiefung in der Plattenkarte weiterzugehen. Dadurch wird der Probenname automatisch in die Seitenleiste geladen.
6. Nachdem die Namen der Proben eingegeben wurden, können die Vertiefungen markiert werden, indem man mit der linken Maustaste auf die Startvertiefung klickt und die Maus über alle im Lauf assoziierten Vertiefungen zieht. Dann werden die Ziele ausgewählt, indem man auf die Kästchen neben jedem Ziel in der Seitenleiste klickt.
7. Auf die Schaltfläche „Actions“ (Aktionen) klicken, die sich oben rechts auf dem Bildschirm befindet, und „Save as“ (Speichern unter) im Dropdown-Menü auswählen.
  - a. Es erscheint ein Dialogfenster, in dem der Benutzer aufgefordert wird, die Datei entsprechend den Informationen zum Probenlauf und dem Speicherort der zu speichernden Datei zu benennen.
  - b. Die neu benannte (.edt) Lauf-Datei auf einem USB-Stick speichern, und diesen in den Computer einstecken.
8. Den USB-Stick auf den Anschluss an der Vorderseite des Geräts übertragen.
9. In den Optionen auf dem Bildschirm des Geräts auf „Load plate file“ (Plattendatei laden) drücken. Das QuantStudio 7 Pro ist ein Gerät mit Touchscreen.
10. Im Bildschirm „Run Queue“ (Laufliste) auf „USB-Laufwerk“ auf der rechten Seite drücken. Dadurch werden alle auf dem USB gespeicherten Plattendateien angezeigt.
11. Auf die Plattendatei drücken, die mit dem durchzuführenden Lauf verbunden ist.
12. Sobald der Lauf abgeschlossen ist, erscheint ein neues Fenster, in dem der Ort der Ergebnisse abgefragt wird.
  - a. Auf „USB drive Connected“ (USB-Laufwerk angeschlossen) drücken, wenn das Symbol nicht bereits hervorgehoben ist, und „Done“ (Fertig) drücken.
13. Die Probenplatte mit 96 Vertiefungen zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der einzelnen Vertiefungen befindet.
  - a. Sicherstellen, dass die Zentrifuge richtig ausbalanciert ist.

- b. Die Platte vorsichtig aus der Zentrifuge ziehen um sicherzustellen, dass alle Flüssigkeiten auf dem Boden der Vertiefungen bleiben.
14. Auf das Doppelpfeil-Symbol drücken, das sich in der oberen rechten Ecke des Bildschirms auf dem Gerät befindet.
  - a. Die Geräteschublade öffnet sich vorne.
15. Die zentrifugierte Platte in den Plattenhalter einsetzen und dabei die korrekte Ausrichtung der Platte sicherstellen.
  - a. Die Vertiefung A1 sollte sich in der Position in der linken oberen Ecke befinden
  - b. Die Platte erscheint leicht schwebend über dem Block aufgrund von zwei Silikonstreifen über und unter dieser Platte. Dies ist zu erwarten, und der Gerätedeckel wird die Platte nach dem Schließen der Schublade nach unten drücken.
16. „Start Run“ (Lauf starten) auf dem Gerätebildschirm drücken.
  - a. Es erscheint ein Dialogfenster, in dem der Benutzer aufgefordert wird, zu bestätigen, dass die Platte geladen wurde.
  - b. Wenn die Platte geladen wurde, erneut „Start Run“ (Lauf starten) drücken oder „Open Drawer“ (Schublade öffnen) drücken, um die Platte in den Block zu legen und dann „Start Run“ (Lauf starten) zu drücken
17. Auswertung der Ergebnisse (siehe Tabelle 4)



M120 – Lyra SARS-CoV-2-Assay-Kit



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Deutschland



**Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701, USA  
[quidel.com](http://quidel.com)

**PIM120102DE00 (09/21)**

## GLOSSAR

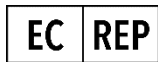
---



Katalognummer



CE-Konformitätszeichen



Autorisierter Vertreter in der Europäischen Union



Chargencode



Verfallsdatum



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck



Verschreibungspflichtig



Für die Verwendung Anleitungen der digitalen Kennzeichnung beachten



Biologische Risiken



Medizinisches Gerät für *In-vitro-Diagnostik*



Inhalt reicht für <n> Bestimmungen



Inhalt/Enthält



Kontrolle

---